

Evaluación del efecto matriz en un ensayo ELISA competitivo usando muestras clínicas para la detección del biomarcador Ag38kDa de tuberculosis

**CAROLINA GALEANO NARANJO**

**Trabajo de grado para optar al título de Ingeniera Biomédica**

**Director**

**Paula Andrea Marín Muñoz**

PhD(c) en Universidad de São Paulo- USP



**UNIVERSIDAD EIA  
INGENIERIA BIOMEDICA  
ENVIGADO  
2018**

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

*El trabajo de grado es dedicado a mis padres,  
hermano, abuela y tío, quienes han sido mi  
constante apoyo, han creído en mí y me  
han acompañado en cada paso que doy.*

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Paula Andrea Marín Muñoz por ser una excelente directora de tesis, por guiarme en el desarrollo de este trabajo con mucha paciencia y compromiso, por depositar en mí todo su conocimiento y especialmente por confiar en mí para la continuación de un proyecto en el que trabajó por años.

A Marisol Jaramillo Grajales por ser una excelente asesora y una profesora ejemplar, por su paciencia, su ayuda y sus consejos, por permitirme hacer parte del grupo de investigación de biomarcadores, por creer en mí y dejarme trabajar a su lado.

A la CIB por suministrarnos las muestras de esputo.

A Kaory Barrientos y Camilo Ortiz por su constante apoyo y sus consejos.

A mis padres, por la confianza depositada en mí, su guía, su paciencia y consejos en el periodo en el que realice este trabajo de grado.

A Natalia Restrepo, Sara Galvis, Juan Pablo Arango y Santiago Restrepo por darme ánimo y ayudarme tanto como fuera posible.

A Mary Freeman, por ser un apoyo constante aún en la distancia.

A Yesid Montoya por su paciencia y ayuda continúa en el desarrollo del modelo.

Y finalmente a la Universidad EIA, a la Universidad CES y a todos los que de una u otra manera estuvieron relacionados con el presente proyecto, gracias por su ayuda.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

## ***TABLA DE CONTENIDO***

1	PRELIMINARES.....	16
1.1	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
1.2	OBJETIVOS DEL PROYECTO .....	17
1.2.1	Objetivo General.....	17
1.2.2	Objetivos Específicos .....	17
1.3	MARCO DE REFERENCIA.....	17
1.3.1	Antecedentes.....	17
1.3.2	Marco teórico .....	18
1.3.2.1	Tuberculosis .....	18
1.3.2.1.1	Mycobacterium tuberculosis.....	18
1.3.2.1.2	Tipos de tuberculosis.....	19
1.3.2.1.3	Respuesta inmune a la tuberculosis .....	19
1.3.2.1.4	Antígeno 38 kDa.....	20
1.3.2.2	Métodos de diagnóstico para la tuberculosis.....	20
1.3.2.2.1	Baciloscopia y cultivo: pruebas estándar para el diagnóstico de Tb.....	20
1.3.2.2.2	Prueba de intradermorreacción a la tuberculina.....	21
1.3.2.2.3	Técnicas moleculares.....	21
1.3.2.3	Inmunoensayos .....	22
1.3.2.4	Ensayo ELISA.....	22
1.3.2.4.1	Tipos de configuración para el ensayo ELISA.....	23
1.3.2.4.1.1	ELISA directo.....	23
1.3.2.4.1.2	ELISA indirecto .....	23
1.3.2.4.1.3	ELISA tipo Sándwich .....	24
1.3.2.4.1.3.1	ELISA tipo Sándwich DAS (Double Antibody Sandwich) ....	24
1.3.2.4.1.3.2	ELISA tipo Sándwich HADAS .....	24
1.3.2.4.1.4	ELISA Competitivo .....	25
1.3.2.4.1.4.1	ELISA Competitivo directo .....	25

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

1.3.2.4.1.4.2	ELISA Competitivo indirecto .....	26
1.3.2.4.1.5	Curva de calibración de un ensayo ELISA competitiva.....	26
1.3.2.4.1.5.1	Modelo logístico de cuatro parámetros.....	26
1.3.2.4.1.5.2	Modelo Lineal .....	27
1.3.2.4.1.5.3	Modelo Cuadrático .....	27
1.3.2.4.1.5.4	Modelo logístico de cinco parámetros .....	27
1.3.2.4.1.6	Efecto Matriz.....	28
2	METODOLOGÍA.....	29
2.1	Materiales y reactivos.....	29
2.2	PROCEDIMIENTO .....	29
2.2.1	ELISA BIDIMENSIONAL INDIRECTO.....	29
2.2.1.1	Tapizado .....	30
2.2.1.2	Lavado del antígeno tapizado .....	31
2.2.1.3	Incubación con el anticuerpo primario AcMyc31 .....	31
2.2.1.4	Lavado del anticuerpo primario.....	31
2.2.1.5	Incubación con el anticuerpo secundario conjugado con HRPO .....	31
2.2.1.6	Lavado del anticuerpo secundario .....	32
2.2.1.7	Revelado.....	32
2.2.1.8	Parada .....	32
2.2.2	Modelo para estimar la señal máxima de un ensayo ELISA bidimensional indirecto .....	33
2.2.2.1	Sistema de procesos.....	33
2.2.2.1.1	Aplicación de la ley de conservación .....	34
2.2.2.1.1.1	Balance total de masa .....	34
2.2.2.1.1.2	Balance total de energía .....	35
2.2.2.1.2	Ecuaciones constitutivas .....	36
2.2.2.1.2.1	Masa .....	36
2.2.2.1.2.2	Energía .....	37
2.2.2.1.2.2.1	Energía térmica .....	37
2.2.2.1.2.2.2	Energía Lumínica .....	38
2.2.2.1.2.2.3	Energía de la reacción de óxido - reducción .....	38

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

2.2.3	ELISA COMPETITIVA .....	39
2.2.3.1	Tapizado .....	40
2.2.3.2	Incubación de la mezcla Ag Competidor + Ac monoclonal primario limitante 40	
2.2.3.3	Incubación con el anticuerpo secundario conjugado con HRPO .....	41
2.2.3.4	Revelado y parada de la reacción colorimétrica .....	41
2.2.4	ENSAYOS DE REPETIBILIDAD PRELIMINAR PARA LA SELECCIÓN DE LA MEJOR CURVA DE CALIBRACIÓN DE UN ENSAYO ELISA COMPETITIVO .....	43
2.2.4.1	Tapizado .....	43
2.2.4.2	Incubación de la mezcla Ag Competidor + Ac monoclonal primario limitante 43	
2.2.4.3	Incubación con el anticuerpo secundario conjugado con HRPO .....	45
2.2.4.4	Revelado y parada de la reacción colorimétrica .....	45
2.2.5	EFFECTO MATRIZ .....	46
2.2.5.1	Tapizado .....	47
2.2.5.2	Incubación de la mezcla Ag Competidor + Ac monoclonal primario limitante 47	
2.2.5.3	Incubación con el anticuerpo secundario conjugado con HRPO .....	48
2.2.5.4	Revelado y parada de la reacción colorimétrica .....	49
2.2.6	MODELO DE AJUSTE DE 4 PARÁMETROS PARA OBTENER LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS ENSAYOS COMPETITIVOS .....	50
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	51
3.1	INMUNOENSAYO ELISA BIDIMENSIONAL INDIRECTO .....	51
3.1.1	Validación del modelo para estimar la señal máxima de un ensayo ELISA bidimensional indirecto .....	53
3.2	INMUNOENSAYO ELISA COMPETITIVO INDIRECTO .....	59
3.2.1	ENSAYOS DE REPETIBILIDAD DE LAS CURVAS COMPETITIVAS PRESELECCIONADAS .....	62
3.3	EFFECTO MATRIZ .....	67
4	CONCLUSIONES .....	72

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

5	REFERENCIAS.....	73
---	------------------	----

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Esquema de distribución de concentraciones de Ag38kDa en los pozos de la placa de micro titulación.....	40
Tabla 2. Esquema de las concentraciones del anticuerpo monoclonal limitante y el Ag competidor en los pozos del plato de ELISA. ....	41
Tabla 3. Diseño de la placa de la ELISA Competitiva con las concentraciones de Ag38kDa, Ag Competidor y Ac Myc31 monoclonal limitante. ....	42
Tabla 4. Esquema de las concentraciones del anticuerpo monoclonal limitante y el Ag competidor en los pozos del plato de ELISA 1 .....	43
Tabla 5. Esquema de las concentraciones del anticuerpo monoclonal limitante y el Ag competidor en los pozos del plato de ELISA 2. ....	44
Tabla 6. Esquema de las concentraciones del anticuerpo monoclonal limitante y el Ag competidor en los pozos del plato de ELISA. ....	48
Tabla 7. Diseño de la placa de la ELISA Competitiva para evaluar el efecto matriz con las concentraciones de Ag38kDa, Ag competidor y Ac Myc31 monoclonal limitante. ....	49
Tabla 8. Parejas de inmunoreactivos Ac/Ag que presentaron valores de absorbancia entre 1 y 2. ....	52
Tabla 9. Comparación de datos teóricos y experimentales para las curvas de [0.012 µg/mL] .....	55
Tabla 10. Comparación de datos teóricos y experimentales para [0.003 µg/mL].....	57
Tabla 11. Comparación de datos teóricos y experimentales para [0.003 µg/mL].....	58
Tabla 12. Parámetros analíticos de las curvas competitivas preliminares ajustadas al modelo logístico de 4 parámetros.....	61
Tabla 13. Parámetros analíticos de las curvas competitivas de repetibilidad para la pareja (0,05 µg/ml, 0,03 µg/ml) ajustadas al modelo logístico de 4 parámetros.....	63
Tabla 14. Parámetros analíticos de las curvas competitivas de repetibilidad para la pareja (0,03 µg/ml, 0,03 µg/ml) ajustadas al modelo logístico de 4 parámetros.....	64
Tabla 15. Parámetros analíticos de las curvas competitivas de repetibilidad para la pareja (0,03 µg/ml, 0,012 µg/ml) ajustadas al modelo logístico de 4 parámetros. ....	66
Tabla 16. Parámetros analíticos promedio de las curvas competitivas de repetibilidad para cada pareja anticuerpo – antígeno que fueron ajustadas al modelo logístico de 4 parámetros.....	66
Tabla 17. Parámetros analíticos de las curvas competitivas del ensayo de efecto matriz ajustadas al modelo logístico de 4 parámetros. ....	69
Tabla 18. Características analíticas de las curvas competitivas del ensayo de efecto matriz, ajustadas al modelo logístico de 4 parámetros. ....	70

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. ELISA Directo (Cultek, 2006b).....	23
Figura 2. ELISA Indirecto (Gan & Patel, 2013b).....	24
Figura 3. ELISA tipo Sándwich DAS (Cultek, 2006b).....	24
Figura 4. ELISA tipo Sándwich HADAS (Gan & Patel, 2013b) .....	25
Figura 5. ELISA Competitivo Directo (Penalva, 2000) .....	25
Figura 6. ELISA Competitivo Indirecto (Gan & Patel, 2013b) .....	26
Figura 7. Secuencia de pasos para la detección del anticuerpo Myc31 por medio de una ELISA bidimensional indirecta (Creative Diagnostics, n.d.) (Thermo Fisher Scientific, n.d.-c) (Thermo Fisher Scientific, n.d.-b) .....	30
Figura 8. Placa almacenada a 4°C .....	31
Figura 9. Placa de micro titulación luego de agregar la solución de revelado.....	32
Figura 10. Placa de ELISA en el Multiskan FC luego de agregar solución de parada.....	33
Figura 11. Secuencia de pasos para la detección de Ag38kDa por medio de una ELISA competitiva indirecta (Creative Diagnostics, n.d.) (Thermo Fisher Scientific, n.d.-d) (Thermo Fisher Scientific, n.d.-c) .....	40
Figura 12. Placa de micro titulación luego de agregar la solución de revelado.....	42
Figura 13. Placa de micro titulación 1 luego de agregar la solución de revelado.....	46
Figura 14. Secuencia de pasos para la detección de Ag38kDa en muestras clínicas por medio de una ELISA competitiva indirecta (Creative Diagnostics, n.d.) (Thermo Fisher Scientific, n.d.-d) (Thermo Fisher Scientific, n.d.-c).....	47
Figura 15. Placa del ensayo matriz luego de ser revelado .....	49
Figura 16. Ensayo Elisa bidimensional indirecta AcMyc31 Vs Ag38kDa de Mtb .....	52
Figura 17. Grafica teórica 0.012µg/mL Ag38kDa .....	54
Figura 18. Grafica experimental 0.012µg/mL Ag38kDa .....	55
Figura 19. Grafica teórica 0.003µg/mL Ag38kDa .....	56
Figura 20. Grafica experimental 0.003µg/mL Ag38kDa .....	56
Figura 21. Grafica teórica 0.03µg/mL Ag38kDa .....	57
Figura 22. Grafica experimental 0.03µg/mL Ag38kDa .....	58
Figura 23. Ensayo ELISA competitivo indirecto preliminar. ....	61
Figura 24. Ensayo de repetibilidad competitivo para la pareja (0,05 µg/ml, 0,03 µg/ml)....	63
Figura 25. Ensayo de repetibilidad competitivo para la pareja (0,03 µg/ml, 0,03 µg/ml)....	64
Figura 26. Ensayo de repetibilidad competitivo para la pareja (0,03 µg/ml, 0,012 µg/ml)..	65
Figura 27. Evaluación del efecto matriz en la curva de calibración de un inmunoensayo ELISA estándar usando, 0,03 µg/ml de anticuerpo Myc31 limitante y 0,012 µg/ml de antígeno Ag38kDa para el tapizado de la placa. Se usó como antígeno competidor el propio Ag38kDa estándar a diferentes concentraciones diluido en diferentes soluciones de muestras de esputo.....	68
Figura 28. Curvas de concentración 0,03 µg/ml de anticuerpo Myc31 limitante y 0,012 µg/ml de antígeno Ag38kDa con diferentes proporciones de solvente PBST: Esputo.....	69

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

## LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Ecuación de la curva de cuatro parámetros .....	26
Ecuación 2. Modelo Lineal .....	27
Ecuación 3. Modelo Cuadrático .....	27
Ecuación 4. Modelo logístico de cinco parámetros .....	27

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

## **RESUMEN**

La tuberculosis (Tb) continúa siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo junto con el VIH/SIDA; aproximadamente 1.5 millones de personas mueren anualmente por causa de esta enfermedad. Estas cifras son, en parte, el resultado de: i) las muchas personas que permanecen con tuberculosis no detectada durante largo tiempo, lo que aumenta el riesgo de diseminación de la enfermedad, ii) las deficiencias en el diagnóstico temprano de los pacientes con cualquier forma de tuberculosis resistentes a fármacos y iii) los retrasos que los pacientes encuentran en la recepción de los resultados de las pruebas de diagnóstico convencional, y no reciben el tratamiento de forma oportuna. Por tanto, la innovación en métodos de diagnóstico rápido y preciso continúa siendo uno de los pilares fundamentales en la lucha contra la tuberculosis.

En respuesta a estos desafíos, en la actualidad ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y los biosensores se encuentran siendo estudiados, debido a que destacan por su rapidez y simplicidad operativa. Estos dispositivos pueden ser utilizados para la detección de biomarcadores importantes de la tuberculosis como el antígeno 38kDa (Ag38kDa). Con el objetivo de impulsar estos prototipos para ser usados en fase clínica es necesario la evaluación del desempeño de cada una de las pruebas usando muestras clínicas, de composición compleja, con el objetivo de analizar si se ve afectada la capacidad analítica de los métodos en comparación con los resultados obtenidos bajo condiciones estándar o controladas.

Por lo anterior, con el desarrollo de esta propuesta se obtuvo una curva de calibración estándar para una ELISA competitiva y se evaluó como la composición de muestras de esputo, puede afectar o no los parámetros analíticos de dicha curva de calibración.

Con el propósito de encontrar una curva de calibración estándar para el ensayo de ELISA competitivo, se realizó un ensayo ELISA bidimensional indirecto, evaluando diferentes concentraciones del antígeno 38kDa y el anticuerpo monoclonal específico Myc31. De acuerdo con los resultados obtenidos en el ensayo bidimensional, se seleccionaron parejas de anticuerpo- antígeno que estuvieran entre 1 y 2 unidades de absorbancia. Estas parejas de inmunoreactivos se usaron como base de un ensayo de competición, así: la concentración de antígeno sería usada para ser inmovilizada en los pozos de la placa. Dicho antígeno tapizado compite con el antígeno de concentración conocida en una muestra, por el anticuerpo a la concentración seleccionada ofrecido durante la reacción de competición. Con base en la comparación analítica de los parámetros de las curvas competitivas (ajustadas a una curva logística de 4 parámetros), se encontró que la mejor pareja de inmunoreactivos, para implementar una curva de calibración en una ELISA competitiva, fue 0.03 µg/mL del anticuerpo Myc 31 y 0.012 µg/mL del antígeno 38kDa para el tapizado de la placa.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Luego, se evaluó el efecto matriz de muestras de esputo sobre la curva de calibración competitiva estándar encontrada anteriormente. Para esto se realizó la dilución de muestras de esputo negativo para Tb, en tampón fosfato salino con tween al 0,05% (PBST) como el solvente estándar del ensayo competitivo. Dichas muestras diluidas fueron contaminadas con las concentraciones conocidas del Ag38kDa para realizar la competición con los inmunoreactivos establecidos a las concentraciones (0.03 µg/mL – 0.012 µg/mL). Usando las diferentes diluciones de muestras de esputo como solventes de las curvas de calibración se evaluó como afecta la matriz de la que se componen estas muestras, a los parámetros analíticos de la curva de calibración previamente hallada.

De este ensayo de efecto matriz se obtuvo que, el cambio parcial o total del solvente estándar por esputo genera una reducción de la señal proporcional a la cantidad de esputo que se utilice como solvente, es decir, que mientras más esputo sea utilizado mayor será la caída de la señal. Por otra parte, los resultados mostraron que una dilución adecuada de muestras de esputo en PBST de 1:100 puede ser usada para la detección del Ag38kDa con anticuerpo anti38kDa (Myc31) en estas muestras, sin afectar las características analíticas del ensayo, debido a que esta dilución presentó una pérdida mínima de la señal máxima y aumentó la sensibilidad de la prueba, en comparación a las demás proporciones de esputo incluso a la curva estándar en PBST.

Palabras clave: ELISA, Ag38kDa, anti38kDa, Myc31, Esputo

## ***ABSTRACT***

Tuberculosis (Tb) remains being one of the main causes of death worldwide ranking above VIH/AIDS, just in 2016 more than 1.3 million people died due to TB. These cases are in part result of several factors; I) there are large gaps in detection and treatment, which increases the risk of spreading the infectious agent, II) lack of early diagnosis for patients with multidrug-resistant TB, III) delays in results of conventional methods for diagnosis and IV) people that do not have access to medical services so they can't have treatment. Therefore, creating innovative methods for a fast and precise diagnosis is still one of the strategies in order to minimize deaths and prevent spread of the disease.

As an answer to all of these challenges, biosensors appeared as a new technology in development that highlight as a result of their simplicity, portability and speed. These devices can be used for detection of important TB biomarkers as Ag38kDa. One of the fundamental stages of development of immunosensors for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) is the validation of these devices in standard and clinical conditions with other techniques, as ELISA. Therefore, in this project we evaluate the matrix-induced effect caused with the clinical samples to the calibration standard curve of a competitive ELISA for the detection of Ag38kDa. The results would be used later on as a reference for the clinic validation of the piezoelectric immunosensor.

# INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (Tb) es una de las enfermedades infecciosas más antiguas en la historia de la humanidad y continúa siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo junto con el VIH/SIDA; aproximadamente 1.5 millones de personas mueren anualmente por causa de esta enfermedad (World Health Organization, 2017). Su erradicación es uno de los objetivos de desarrollo sostenible (SDG) adoptado en el 2016 por las Naciones Unidas para el año 2030. La estrategia exige una reducción del 80% en la tasa de incidencia de la tuberculosis y una reducción del 90% de las muertes por esta enfermedad para el 2030 (World Health Organization, 2017). Esta estrategia se basa, entre otros, en la implementación de métodos alternativos de diagnóstico para la detección temprana de la tuberculosis (Keeler *et al.*, 2006). Para el diagnóstico de Tb existen diferentes métodos, entre los cuales se encuentran la baciloscopia y el cultivo como métodos *gold estándar*, la prueba de intradermorreacción a la tuberculina, PCR y diferentes métodos serológicos. Sin embargo, pese a que estos métodos son funcionales y ampliamente usados por los sistemas de salud, tienen deficiencias importantes como: un alto tiempo de espera para la obtención de resultados, falsos positivos, necesidad de personal capacitado para su realización y equipamiento especializado, además de reactivos costosos, propiciando un alto riesgo de contagio lo que conlleva a un aumento de los índices de diseminación de la enfermedad (Caminero, Casal, Ausina, Pina, & Sauret, 2000).

En respuesta a estos desafíos, en la actualidad el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y los biosensores destacan como opciones para detección de tuberculosis dada su rapidez y simplicidad operativa. Es la línea de investigación de biomarcadores de la Universidad EIA se vienen desarrollando proyectos relacionados con un Inmunosensor Piezoeléctrico de alta frecuencia (HFF-QCM), con financiación de Colciencias (Py. 1333-521-28657), para la detección del biomarcador de tuberculosis a partir del Ag38kDa y un ensayo ELISA competitiva cuantitativa para la detección del mismo biomarcador, ambos métodos desarrollados bajo condiciones estándar. (Jaramillo Grajales, 2016), (Marín *et al.*, 2015a).

Con el objetivo de impulsar estos prototipos para ser usados en fase clínica es necesario la evaluación del desempeño de cada una de las pruebas usando muestras clínicas, de composición compleja, con el objetivo de analizar si se ve afectada la capacidad analítica de los métodos en comparación con los resultados obtenidos bajo condiciones estándar o controladas.

Con la presente propuesta se pretende: i) obtener una curva de calibración estándar de un ensayo ELISA competitivo, como base para la posterior cuantificación del Ag38kDa de *Mtb* y ii) evaluar el efecto de la composición de muestras de esputo sobre la curva de calibración competitiva previamente obtenida. Estos resultados pueden ser usados en las etapas de validación clínica de un inmunosensor piezoeléctrico para la detección y cuantificación del Ag38kDa de *Mtb* en el formato de inmunoensayo competitivo. La validación clínica de estos

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

dispositivos son etapas fundamentales para la liberación de estos prototipos con el objetivo de ser usados como métodos alternativos de diagnóstico de la Tb.

Como valor agregado del trabajo se planteó un modelo matemático para determinar, a partir de diversas ecuaciones propuestas, los valores de absorbancia de las curvas que se obtienen con diferentes concentraciones de los inmunoreactivos para un ensayo ELISA bidimensional, con el fin de ahorrar reactivos y tiempo en esta etapa previa a la obtención de una curva de calibración competitiva.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

# 1 PRELIMINARES

## 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tuberculosis (Tb) continúa siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo junto con el VIH/SIDA, con aproximadamente 1.5 millones de muertes por año (World Health Organization, 2017). Para el diagnóstico de la tuberculosis existen diferentes métodos, como la baciloscopia y el cultivo, la prueba de intradermorreacción a la tuberculina, PCR y diferentes métodos serológicos. Sin embargo, todos los anteriores presentan ciertas desventajas; los resultados que se obtienen del método de baciloscopia y cultivo pueden tomar semanas, propiciando un alto riesgo de contagio que conlleva a un aumento de los índices de diseminación de la enfermedad. Por otro lado, la prueba de la intradermorreacción a la tuberculina tiene un rango de sensibilidad entre el 68% y 95%, dependiendo de la dosis de tuberculina administrada, el tiempo post-infección, inmunosupresión, post-parto y el intervalo de variación del observador, como resultado la prueba puede presentar falsos negativos. Finalmente métodos como la PCR presentan un alto costo debido al personal altamente capacitado que debe realizarlos y a los equipos altamente especializados (Caminero et al., 2000) (Monaghan, Doherty, Collins, Kazda, & Quinn, 1994).

Por lo anterior, métodos de diagnóstico como el ***Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas*** (ELISA) y los biosensores se encuentran siendo estudiados para ser utilizados en la detección de tuberculosis, debido a que se destacan por la rapidez en la entrega de resultados y su sensibilidad (Arnau, 2008). En la línea de investigación de biomarcadores de la Universidad EIA, se han venido trabajando paralelamente estos dos métodos de diagnóstico para la detección del biomarcador Ag38kDa, ambos con un formato competitivo, y cuyo grado de desarrollo se encuentra en etapa de validación bajo condiciones controladas. Con el objetivo de impulsar estos prototipos para ser usados en fase clínica es necesario la evaluación del desempeño de cada una de las pruebas usando especímenes clínicos, ya que estas muestras presentan una composición compleja que afecta la capacidad analítica de los ensayos obtenida bajo condiciones estándar o controladas, pudiendo presentar una alteración en los resultados (Jaramillo, 2016).

Con el desarrollo de esta propuesta pretendemos obtener una curva de calibración estándar para una ELISA competitiva y evaluar, como la composición de muestras de esputo, puede afectar o no los parámetros analíticos de dicha curva de calibración. Estos resultados podrán ser usados como referencia para comparar el desempeño de un inmunosensor para la detección del Ag38kDa de *Mtb* en su fase de validación estándar y clínica, con el propósito de ser usado como método alternativo en el diagnóstico oportuno de la Tb.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.



## **1.2 OBJETIVOS DEL PROYECTO**

### **1.2.1 Objetivo General**

Evaluar el efecto de la composición de muestras clínicas sobre la curva de calibración de un inmunoensayo estándar tipo ELISA competitivo para la detección del Ag38 kDa como biomarcador de tuberculosis.

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

- Determinar las concentraciones de los inmunoreactivos, antígeno y anticuerpo, a partir de las cuales se establecen las condiciones limitantes para el inmunoensayo competitivo.
- Obtener una curva de calibración estándar del ensayo ELISA competitivo para la detección del Ag38kDa de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Evaluar el efecto de la composición de muestras de esputo de pacientes o efecto matriz sobre la curva de calibración estándar del ensayo ELISA competitivo.

## **1.3 MARCO DE REFERENCIA**

### **1.3.1 Antecedentes**

Para el desarrollo de este trabajo de grado se cuenta con el respaldo del grupo de investigación en Ingeniería Biomédica de la Universidad EIA, GIBEC, en la línea de Tecnologías para la detección de biomarcadores. Esta línea de investigación viene desarrollando proyectos relacionados con inmunosensores piezoeléctricos para diversas aplicaciones desde el 2007, en colaboración con el Instituto Interuniversitario de Investigación en Bioingeniería y Tecnología Orientada en el Ser Humano -i3BH- de la Universidad Politécnica de Valencia, España y la unidad de Bacteriología y Micobacterias de la CIB-UPB. Bajo esta colaboración se desarrolló un Inmunosensor Piezoeléctrico de alta frecuencia (HFF-QCM), con financiación de Colciencias, para la detección del biomarcador de *Mtb* (Ag38kDa) y un ensayo ELISA competitiva cuantitativa para la detección del mismo biomarcador, ambos métodos desarrollados bajo condiciones estándar. Los resultados de estas investigaciones generaron: una tesis doctoral, una disertación de maestría, una publicación científica, tres publicaciones técnicas y diversas divulgaciones en eventos académicos y científicos (Marín et al., 2015b),(Jaramillo, 2016).

En la tesis doctoral de Jaramillo (2016), se desarrolló un inmunoensayo competitivo para la detección de un biomarcador de tuberculosis en una plataforma del tipo HFF-QCM (High Fundamental Frequency – Quartz Crystal Microbalance), la cual presentó parámetros analíticos similares a los obtenidos en una prueba convencional como el ELISA. Los resultados del trabajo permitieron establecer que: i) el ensayo ELISA competitivo desarrollado como estándar para la comparación analítica con el biosensor, podría constituirse por sí mismo como un importante método estándar de diagnóstico de Tb

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

mediante la cuantificación del Ag38 kDa en muestras de esputo, ya que dicho ensayo en una plataforma ELISA usando muestras de esputo no se encuentra disponible comercialmente, ii) la segunda fase en la validación del inmunosensor piezoeléctrico desarrollado, para ser usado en el diagnóstico de Tb, implica la comparación del desempeño del dispositivo con un ensayo estándar como el ELISA usando muestras reales o especímenes clínicos, esto con el fin de conocer la reproducibilidad analítica del prototipo para ser usado en campo.

### **1.3.2 Marco teórico**

#### **1.3.2.1 Tuberculosis**

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, que afecta generalmente a los seres humanos y es considerada como un problema de salud pública en el mundo, debido a las altas tasas de morbi-mortalidad que presenta (World Health Organization, 2017). Dicha infección es transmitida de persona a persona a través del aire, cuando un portador de la enfermedad expulsa bacilos tuberculosos al toser, estornudar o escupir (OMS, octubre de 2016). En los últimos años factores de riesgo como el alcoholismo, la diabetes, el tabaquismo, la inmunosupresión por la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la desnutrición y el bajo nivel socioeconómico han influido en el número de casos de tuberculosis (Lonnroth & Raviglione, 2008).

El reporte emitido por la OMS para el 2017 indicó unos 6.3 millones de casos nuevos de tuberculosis en el año 2016, con un aproximado de 10.4 millones totales de personas enfermas, de los cuales aproximadamente 1.0 millones son niños. Las tasas de incidencia más bajas se presentan en los países con altos ingresos como el Oeste de Europa, Canadá, Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda; con una tasa de incidencia menor de 10 casos por 100 000 habitantes por año, mientras que en las Américas la tasa es inferior a 50 casos por 100 000 habitantes por año (López, 2016a)(World Health Organization, 2017).

En Colombia, el SIVIGILA (Instituto Nacional de Salud), reportó 11539 casos de tuberculosis en el año 2016, de los cuales 2123 corresponden al departamento de Antioquia (López, 2016b). Además, se tiene conocimiento de que en el 2015, se presentaron 11647 casos en Colombia, de los cuales 2205 casos se presentaron en Antioquia (López, 2015).

##### **1.3.2.1.1 Mycobacterium tuberculosis**

El género *Mycobacterium* se encuentra integrado por un complejo de 150 especies colectivamente denominadas bacilos tuberculosos, encargado de causar la tuberculosis. Las especies pertenecientes a este complejo son *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti* y *Mycobacterium tuberculosis*, siendo esta última la más importante desde el punto de vista clínico, ya que genera diferentes grados de patogenicidad y virulencia en humanos, además de ser la especie más común (Glickman & Jacobs, 2001).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

La *Mycobacterium tuberculosis* es una bacteria de multiplicación lenta y con características aerobias, a la cual también se le conoce como bacilo de Koch. Es un organismo con resistencia innata a los agentes terapéuticos y a las defensas del hospedero, debido a su envoltura celular, caracterizada por la presencia de una variedad de lípidos complejos. Esta característica le confiere baja permeabilidad, razón por la cual se tiene un alto grado de dificultad para combatir las enfermedades micobacterianas en la actualidad (Torrelles & Schlesinger, 2010).

#### **1.3.2.1.2 Tipos de tuberculosis**

La vía de entrada del bacilo tuberculoso al cuerpo es a través del tracto respiratorio, por medio de la inhalación de núcleos de gotas que miden menos de 2 mm. Una vez estos organismos pasan al tracto respiratorio inferior y han penetrado en el pulmón, se pueden presentar cuatro casos: i) muerte de los bacilos, debido a una respuesta inmune eficaz por parte del hospedero; ii) multiplicación del patógeno después de la infección, ocasionando lo que se conoce clínicamente como tuberculosis primaria; iii) neutralización de los bacilos por parte del sistema inmune, lo que se conoce clínicamente como infección latente; o iv) reactivación y eventual crecimiento de los bacilos resultando en infección activa por tuberculosis. (Schluger & Rom, 1998).

#### **1.3.2.1.3 Respuesta inmune a la tuberculosis**

La defensa inicial contra la infección por *Mycobacterium tuberculosis*, una vez que llega a las vías respiratorias inferiores, es el macrófago alveolar, el cual se encarga de inhibir el crecimiento del bacilo a través de la fagocitosis. Luego de que las bacterias patógenas son fagocitadas, son expuestas a diferentes mecanismos que conllevan a su destrucción y son mediados por citosinas, estos mecanismos son: la fusión fagosoma-lisosoma y la generación de especies reactivas de nitrógeno, en particular el óxido nítrico, entre otros. Se encuentran además, otras células inmunes que ofrecen ayuda a los macrófagos en el control del crecimiento de micobacterias: los linfocitos T, que pueden ser reclutados por los macrófagos estimulándolos para inhibir el crecimiento o mitigar las micobacterias y los linfocitos T citotóxicos que pueden ingerir macrófagos que han fagocitado micobacterias, además de poder secretar proteínas pequeñas como TIA-1, molécula asociada a la apoptosis (Schluger & Rom, 1998).

Aunque existe un papel para muchos linfocitos T en la defensa del hospedero contra *Mycobacterium tuberculosis* (células  $\alpha/\beta$  CD4+ y CD8+, linfocitos T citotóxicos y linfocitos T  $\gamma/\delta$ ), la célula efectora principal ante la presencia de este bacilo es el linfocito TCD4+. Por otra parte, las células TCD8+, que también juegan un papel importante, reconocen antígenos que han sido procesados en el citosol y se presentan en el contexto de las moléculas de MHC clase I en la superficie celular. De igual manera, las células CD4+ son las encargadas de ayudar a amplificar la respuesta inmune del huésped mediante la activación de células efectoras y el reclutamiento de células inmunes adicionales al sitio de la enfermedad, mientras que las células CD8+ son más propensas a ser directamente citotóxicas para células diana (Schluger & Rom, 1998).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

#### **1.3.2.1.4 Antígeno 38 kDa**

La proteína 38 kDa (también denominado antígeno 5, antígeno 78, Rv0934) es considerada uno de los antígenos más inmunogénicos en la tuberculosis multibacilar activa y uno de los antígenos de secreción más estudiados. Se trata de una lipoproteína glicosilada de unión a fosfato de liberación lenta al ambiente extracelular, la cual puede ser encontrada tanto intracelularmente, como segregada en el sobrenadante del cultivo extracelular de *Mycobacterium tuberculosis* en el medio sintético Sauton's (Marín et al., 2015a). Por sus características este antígeno es usado en diferentes ensayos para el diagnóstico de la tuberculosis con sensibilidades que oscilan entre el 15% y el 94%, según el estado de frotis de esputo del paciente y de la población utilizada en los estudios. El uso del Ag38kDa en ensayos ELISA se ha implementado en diferentes laboratorios en todo el mundo, obteniendo una sensibilidad en un rango de 40% a 89% y una especificidad entre un 44% y un 100%, principalmente en pruebas de tipo serológicas o de detección de anticuerpos contra el antígeno. Las pruebas serodiagnósticas basadas en el antígeno 38kDa, han sido estudiadas para la detección de diferentes anticuerpos específicos para diferentes tipos de tuberculosis, como la tuberculosis ósea y articular, la pleuritis tuberculosa y la meningitis tuberculosa (Abebe, Holm-Hansen, Wiker, & Bjune, 2007). En la actualidad no ha sido reportado algún estudio o kit comercial en que se use una ELISA competitiva para la detección de este antígeno en muestras de esputo.

#### **1.3.2.2 Métodos de diagnóstico para la tuberculosis**

En la actualidad, la tuberculosis carece de un método de diagnóstico rápido y preciso, lo cual obstaculiza el comienzo oportuno del tratamiento. Las pruebas para el diagnóstico de esta enfermedad, como la prueba de la tuberculina, la baciloscopia y el cultivo, además de los métodos moleculares y serodiagnósticos, suelen variar en sensibilidad, especificidad, velocidad en la entrega de resultados y costo (Jaramillo et al., 2015). Las muestras a ser evaluadas pueden ser muy variadas, tales como: sangre, biopsias, pus de cavidades abiertas, líquido cefalorraquídeo u orina; por tanto, se hablará brevemente sobre las muestras de esputo, debido a que son las que se trabajaran en el presente trabajo.

#### **Espuito**

La mucosa es uno de los componentes críticos de la función inmune de los pulmones. Esta mantiene las vías de aire hidratadas y se encarga de atrapar partículas, bacterias y virus; además de tener actividades antioxidantes, antiproteasa y antimicrobiales. En enfermedades como la tuberculosis, en las secreciones de las vías respiratorias como la mucosa predominan grandes polímeros, como el ADN, filamentos de actina filamentosa, proteoglicanos y biopelículas, en combinación con la bacteria y células inflamatorias (Voynow & Mengr, 2009).

##### **1.3.2.2.1 Baciloscopia y cultivo: pruebas estándar para el diagnóstico de Tb**

El diagnóstico de tuberculosis por baciloscopia de muestras clínicas puede realizarse de forma confiable en el laboratorio, demostrando la presencia de bacilos en la muestra de la

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

lesión (Organización Panamericana de la Salud, 2008). La baciloscopia es la prueba más usada alrededor del mundo para el diagnóstico de la tuberculosis. Esta es una prueba sencilla en la que se detecta la presencia de hasta un bacilo en una muestra de la lesión por medio de valoración microscópica coloreada con la técnica de Ziehl-Neelsen (Paz, 2005). Debido a que la enfermedad puede presentarse en cualquier órgano, las muestras a ser evaluadas pueden ser muy variadas, tales como: sangre, biopsias, pus de cavidades abiertas, líquido ceforraquídeo u orina. Estas muestras de lesiones extra pulmonares requieren ser procesadas siempre adicionalmente por cultivo (Caminero et al., 2000). Pese a ser la prueba más usada a nivel mundial, la baciloscopia de esputo no es específica para *Mycobacterium tuberculosis* debido a que todas las micobacterias tienen la propiedad de colorearse con la técnica de Ziehl-Neelsen, además se requiere de un número elevado de bacilos por mililitro de muestra para que la baciloscopia sea positiva (Organización Panamericana de la Salud, 2008).

A diferencia de la baciloscopia, el cultivo puede detectar alrededor de 10 a 1000 bacilos por mililitro de muestra, sin embargo esta técnica requiere de laboratorios con infraestructura adecuada, personal capacitado y puede tomar semanas el obtener un resultado debido al crecimiento lento de *Mycobacterium tuberculosis* (entre cinco a 10 días en cultivo líquido y entre cuatro a ocho semanas en cultivo sólido) (Palomino, Cardoso, & Ritacco, 2007).

#### **1.3.2.2.2 Prueba de intradermorreacción a la tuberculina**

La prueba cutánea PPD (*Purified Protein Derivative*) es basada en la reacción de hipersensibilidad que se presenta como respuesta al inyectar una mezcla de antígenos de bacilos tuberculosos. Es un método de diagnóstico simple, económico y no necesita equipos especializados, por lo cual es muy usado en países de bajos recursos. Sin embargo esta prueba requiere entre 48 a 72 horas para entregar el diagnóstico, además de los falsos resultados (positivos o negativos) que pueden presentarse debido a enfermedades cutáneas, inmunizaciones previas, estadios de la enfermedad y edad del individuo; además de ser altamente dependiente del personal capacitado para realizar las interpretaciones de la misma, lo que hace difícil establecer un diagnóstico preciso solamente utilizando este tipo de prueba (Kunst, 2006) (Jaramillo et al., 2015).

#### **1.3.2.2.3 Técnicas moleculares**

Las técnicas moleculares basadas en la técnica de PCR se posicionan actualmente como las más confiables y con los avances más recientes en lo que corresponde al diagnóstico de tuberculosis, principalmente de cepas multiresistentes. Estas pruebas poseen tres etapas generales para su desarrollo: la extracción del ADN de la micobacteria en un laboratorio nivel III de bioseguridad, la amplificación de regiones específicas del genoma de la micobacteria y finalmente su detección, por medio de técnicas como la electroforesis, ensayos de hibridación empleando sondas y detección en tiempo real, entre otros. Pese a esto, el diagnóstico a partir de técnicas moleculares requiere equipos sofisticados, personal capacitado y reactivos de alto costo (Bekmurzayeva, Sypabekova, & Kanayeva, 2013).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

En los últimos años, la OMS avaló la primera prueba molecular rápida que puede ser usada para la detección simultánea de tuberculosis pulmonar y tuberculosis resistente al antibiótico rifampicina, conocida como Xpert MTB/RIF, la cual se recomienda como un primer método de diagnóstico en niños y adultos, debido a su sensibilidad, especificidad, bajo costo y simplicidad (Noor, Shephard, & Bastian, 2015).

### **1.3.2.3 Inmunoensayos**

Desde hace varias décadas, se vienen realizando esfuerzos con el fin de desarrollar una prueba diagnóstica para la tuberculosis activa basada en la detección de anticuerpos, sin embargo, pese a los esfuerzos ninguna prueba ha alcanzado una adecuada especificidad y sensibilidad (Jaramillo et al., 2015). Esto ha motivado el interés de diferentes grupos de investigación en todo el mundo para desarrollar inmunoensayos en plataformas de ELISA a partir del estudio de diferentes antígenos y anticuerpos de *Mycobacterium tuberculosis*. Esta técnica se ha utilizado para detectar anticuerpos frente a diversos antígenos de tuberculosis purificados como CFP – 10, ESAT- 6, MTB81 y 38kDa o complejos de antígenos crudos de *Mycobacterium tuberculosis* como la PPD (Chan, Heifets, & Iseman, 2000).

### **1.3.2.4 Ensayo ELISA**

El ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) fue desarrollado en 1971 por los investigadores Engvall y Perlmann, como una modificación del radioinmunoensayo (RIA). El ensayo ELISA se basa en el concepto de inmunología básica, según el cual un antígeno se une a su anticuerpo específico, permitiendo así detectar pequeñas cantidades de inmunocomplejos compuestos de moléculas como proteínas, péptidos, hormonas o antígenos en una muestra (Gan & Patel, 2013a). La señal obtenida de esta unión, se debe a la acción de una enzima acoplada o conjugada generalmente a un anticuerpo secundario durante el reconocimiento de un inmunocomplejo, por la inmovilización o fijación del otro componente de la reacción a un soporte sólido preferiblemente (Jaramillo Grajales, 2016).

Posterior a la inmovilización de uno de los inmunocomponentes, los pozos deben ser bloqueados con una solución de proteína no reactiva, tal como la albúmina de suero bovino, con el objetivo de bloquear cualquier área de estos que no se encuentre ocupada por el inmunoreactivo, aumentando la capacidad de reconocimiento del analito y la especificidad del ensayo.

Las enzimas empleadas en estos inmunoensayos deben cumplir ciertas características, tales como, elevada especificidad, disponibilidad de un sustrato estable, que dé lugar a un producto fácilmente detectable, de bajo costo, compatible con un amplio rango de medios de reacción y condiciones de ensayo, posibilidad de ser conjugada con anticuerpos y baja afinidad por la fase sólida. Estas enzimas son usadas como catalizador de una reacción colorimétrica, la cual tiene lugar tras la adición del sustrato específico para la enzima en una solución de revelado estándar. La fase sólida en su mayoría es una placa de poliestireno de 96 pocillos, la cual permite la inmovilización por adsorción pasiva de manera sencilla y eficaz de los inmunocomponentes. Una de las enzimas más usadas es la [La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.](#)



peroxidasa de rábano picante, una glicoproteína de 44 kDa, que posee 308 aminoácidos, de los cuales cuatro son lisinas con grupos aminos disponibles para la conjugación con el reactivo revelador, que en la mayoría de los casos son anticuerpos secundarios, sin pérdida de la capacidad de reconocimiento o actividad del anticuerpo (Jaramillo, 2016).

#### 1.3.2.4.1 Tipos de configuración para el ensayo ELISA

##### 1.3.2.4.1.1 ELISA directo

El ensayo ELISA directo corresponde a un tipo de formato en el cual, el antígeno presente en una muestra clínica de interés, es la molécula que se adhiere a la placa para reaccionar posteriormente con un anticuerpo específico dispensado en los pozos y que está conjugado directamente con una enzima reveladora. Este tipo de ensayos se usa generalmente para la valoración de un antígeno específico en una muestra (Cultek, 2006a)(Cultek, 2006a)(Cultek, 2006a)(Cultek, 2006a). Este tipo de configuración del ensayo no es muy usado ya que implica la conjugación directa de un anticuerpo de reconocimiento primario con la enzima reveladora, lo que en la mayoría de los casos resulta en la pérdida de la capacidad de reconocimiento del anticuerpo por los epítopes del antígeno, además de los altos costos del proceso de conjugación de la enzima con dicho anticuerpo de reconocimiento primario (Cultek, 2006a).

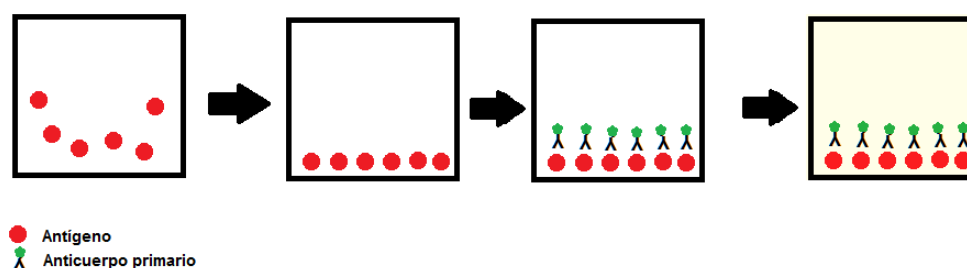


Figura 1. ELISA Directo (Cultek, 2006b)

##### 1.3.2.4.1.2 ELISA indirecto

El ensayo ELISA indirecto corresponde a una configuración del inmunoensayo en el cual un antígeno estándar o comercial se adhiere a los pozos de la placa para la detección o “screening” de anticuerpos en muestras de suero. Estos ensayos se conocen convencionalmente como pruebas serológicas o en este caso ELISA serológico. El inmunocomplejo es posteriormente detectado por un anticuerpo secundario conjugado con la enzima catalizadora. En la interpretación del ensayo se debe tener en cuenta que, la concentración de anticuerpo específico presente en el suero, se correlaciona directamente con la intensidad del color que resulta de la acción de la enzima sobre su sustrato (Gan & Patel, 2013b).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

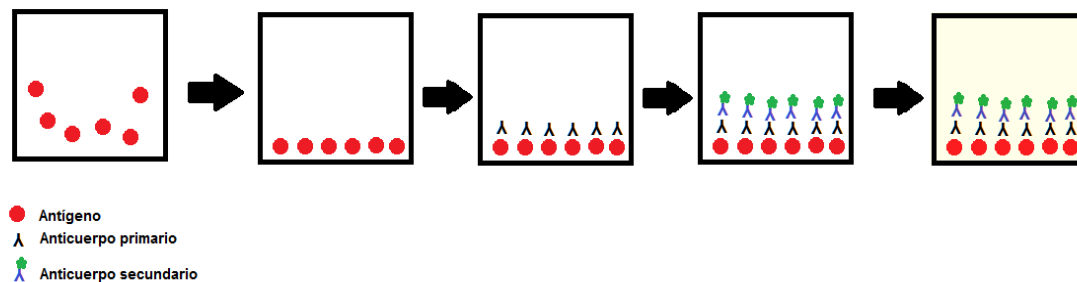


Figura 2. ELISA Indirecto (Gan & Patel, 2013b)

### 1.3.2.4.1.3 ELISA tipo Sándwich

#### 1.3.2.4.1.3.1 ELISA tipo Sándwich DAS (Double Antibody Sandwich)

El formato de ELISA tipo Sándwich es utilizado para identificar un antígeno específico en una muestra clínica de interés. En este caso un anticuerpo primario específico comercial se adhiere a la superficie de los pozos. A continuación, se añade el mismo anticuerpo primario estándar que está conjugado con la enzima reveladora (Cultek, 2006b).

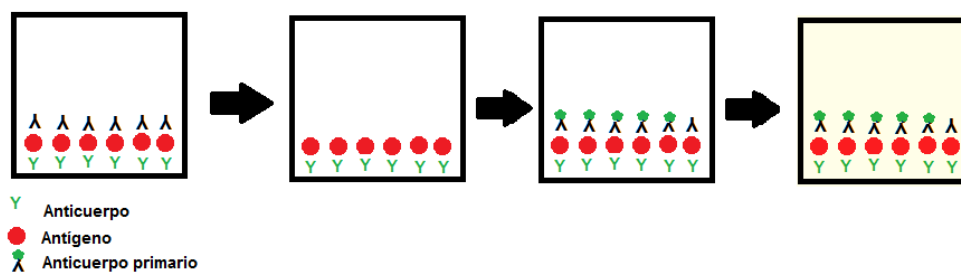


Figura 3. ELISA tipo Sándwich DAS (Cultek, 2006b)

#### 1.3.2.4.1.3.2 ELISA tipo Sándwich HADAS

El formato de ELISA Sándwich HADAS, es utilizado para identificar un antígeno específico en una muestra, usando anticuerpos específicos contra diferentes epítopes del mismo antígeno, lo que le confiere una muy alta especificidad a la prueba. En este caso a diferencia del anterior, el inmunocomplejo (sándwich) es reconocido por un anticuerpo secundario conjugado con una enzima catalizadora. (Gan & Patel, 2013b).



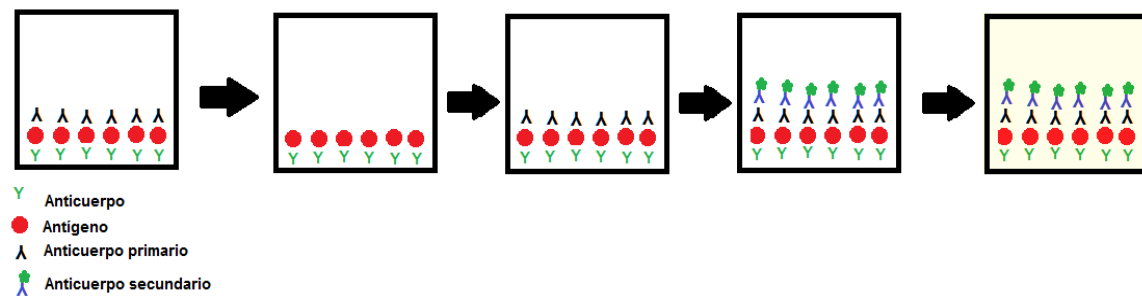


Figura 4. ELISA tipo Sándwich HADAS (Gan & Patel, 2013b)

#### 1.3.2.4.1.4 ELISA Competitivo

##### 1.3.2.4.1.4.1 ELISA Competitivo directo

En el formato de ELISA competitivo directo, el evento diferenciador es el proceso de competición entre el antígeno de una muestra y el mismo antígeno recombinante comercial o estándar que se encuentra inmovilizado en los pozos de la placa. En este ensayo un anticuerpo primario estándar o comercial (preferencialmente monoclonal específico) es incubado previamente con la muestra clínica a una concentración limitante. Dicha mezcla es adicionada a los pozos que contienen el antígeno estándar inmovilizado. De esta forma cuanto más antígeno presente en la muestra, habrá menor cantidad de anticuerpo primario disponible para unirse con el antígeno estándar inmovilizado en los pozos. La detección de los inmunocomplejos formados en este caso es directa, ya que el anticuerpo primario se encuentra conjugado con la enzima catalizadora. En este tipo de ensayo una muestra positiva origina la menor señal colorimétrica; en otras palabras, la ausencia de color indicará la presencia del antígeno de interés en la muestra (Penalva, 2000).

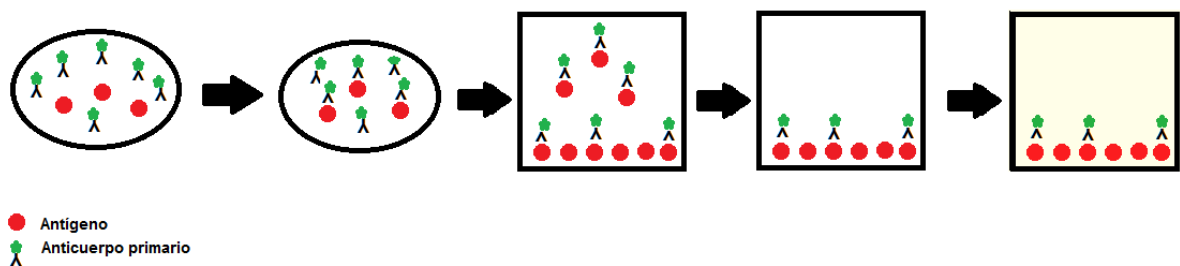


Figura 5. ELISA Competitivo Directo (Penalva, 2000)

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

#### 1.3.2.4.1.4.2 ELISA Competitivo indirecto

En el ELISA competitivo indirecto, que es la configuración que será usada en este proyecto, la detección de un antígeno en una muestra clínica se realiza como en el caso anterior. Sin embargo, la detección de los inmunocomplejos incluye la adición de un anticuerpo secundario que se encuentra conjugado con la enzima catalizadora (Gan & Patel, 2013b).

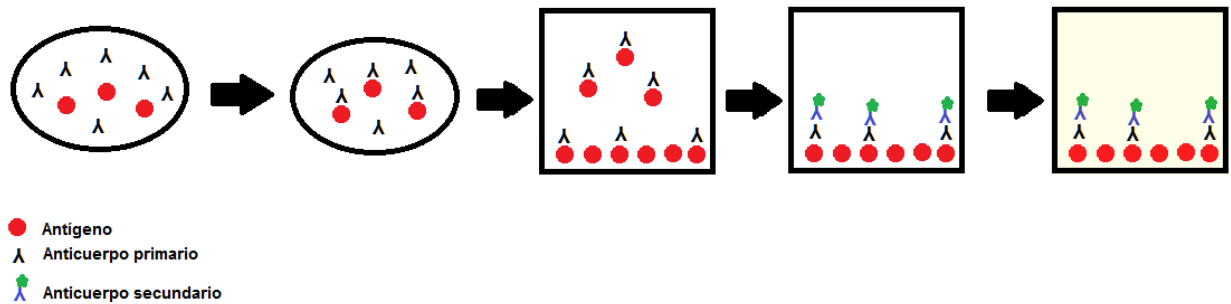


Figura 6. ELISA Competitivo Indirecto (Gan & Patel, 2013b)

#### 1.3.2.4.1.5 Curva de calibración de un ensayo ELISA competitiva

En los ensayos ELISA competitiva para la detección de antígenos, posterior a la detección colorimétrica, la placa debe ser leída por un espectrofotómetro o lector de ELISA, con el fin de determinar los valores de absorbancia de cada pozo, los cuales estarán relacionados con la ausencia o presencia de antígeno. Para determinar la cantidad de un antígeno en una muestra, se realiza un ajuste no paramétrico de los valores de absorbancia obtenidos por el lector de ELISA, utilizando un modelo para ajustar los valores de absorbancia y así obtener una curva que permita la cuantificación de la concentración del analito o antígeno en la muestra (Cox, Devanarayan, Kriauciunas, Montrose, & Sittampalam, 2014). A continuación, se presentan algunos modelos usados para obtener una curva de calibración de un ensayo ELISA competitivo.

##### 1.3.2.4.1.5.1 Modelo logístico de cuatro parámetros

$$y = \frac{(A - D)}{\left[1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B\right]} + D$$

Ecuación 1. Ecuación de la curva de cuatro parámetros

El modelo logístico de cuatro parámetros es uno de los más usados para obtener la curva de calibración de este tipo de ensayos y será usado en el desarrollo del presente trabajo. En la ecuación 1 “x” corresponde al valor de las concentraciones de antígeno estándar usadas para definir la curva cuantitativa, “y” corresponde a la absorbancia arrojada por el lector de ELISA (Unidades de Absorbancia), “A” es el valor de la asíntota máxima (señal La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

máxima), B es la pendiente de la curva en el punto de inflexión, C es la concentración de analito en el punto de inflexión, que produce una inhibición aproximadamente igual al 50% de la señal máxima ( $I_{50}$ ) y D corresponde al valor de la asíntota mínima (señal de fondo). Debido a que la  $I_{50}$  corresponde a una estimación tanto de la afinidad del anticuerpo hacia el analito como de la sensibilidad del método, entre más sensible sea el inmunoensayo, menor será su  $I_{50}$  (Brady, 1995).

#### 1.3.2.4.1.5.2 Modelo Lineal

$$Response = a + b(Concentration) + error$$

*Ecuación 2. Modelo Lineal*

En el modelo lineal representado por la ecuación 2 “a” y “b” corresponden al intercepto y la pendiente respectivamente, “Response” corresponde a la señal leída, que usualmente suele ser la densidad óptica. A menudo se incorpora una transformada logarítmica de la respuesta y la concentración, lo que le otorga el nombre del “modelo log-log linear” (Cox et al., 2014).

#### 1.3.2.4.1.5.3 Modelo Cuadrático

$$Response = a + b(Concentration) + c(Concentration)^2 + error$$

*Ecuación 3. Modelo Cuadrático*

En el modelo cuadrático representado por la ecuación 3 “a”, “b” y “c” corresponden al intercepto, el coeficiente lineal y el coeficiente cuadrático, respectivamente (Cox et al., 2014).

#### 1.3.2.4.1.5.4 Modelo logístico de cinco parámetros

$$Response = Top + \frac{(Bottom - Top)}{\left[ 1 + \left( \frac{concentration}{EC_{50}} \right)^{Slope} \right]^{Asymmetry}}$$

*Ecuación 4. Modelo logístico de cinco parámetros*

En el modelo de cinco parámetros de la ecuación 4 “Concentration” corresponde al valor de las concentraciones de antígeno estándar usadas para definir la curva cuantitativa, “Response” corresponde a la absorbancia arrojada por el lector de ELISA (Unidades de Absorbancia), “Bottom” es el valor de la asíntota máxima (señal máxima), “Slope” es la pendiente de la curva en el punto de inflexión, “ $EC_{50}$ ” es la concentración de analito en el

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

punto de inflexión, que produce una inhibición aproximadamente igual al 50% de la señal máxima ( $I_{50}$ ), “Top” corresponde al valor de la asíntota mínima (señal de fondo) y “Asymmetry” indica el grado de asimetría en la forma de la curva, está relacionado con el parámetro “ $EC_{50}$ ”. Debido a que la  $I_{50}$  corresponde a una estimación tanto de la afinidad del anticuerpo hacia el analito como de la sensibilidad del método, entre más sensible sea el inmunoensayo, menor será su  $I_{50}$  (Cox et al., 2014).

#### **1.3.2.4.1.6 Efecto Matriz**

Cuando una muestra presenta impurezas o posee otras moléculas diferentes al analito de interés, se dice que el analito está disuelto en una matriz. Las características de dicha matriz pueden variar la forma como se reconoce la molécula de interés en un ensayo de detección; es a esto a lo que se denomina efecto matriz. En este caso cuando se analiza una muestra clínica y no una muestra purificada, se deben ajustar las características analíticas de las pruebas de detección obtenidas bajo condiciones estándar o controladas, a nuevas condiciones ajustadas considerando el efecto de la matriz o composición de las muestras reales o especímenes clínicos para los cuales la prueba fue desarrollada (Hajšlová et al., 1998).

Por lo anterior, cuando en la presente propuesta se habla de efecto matriz, se hace referencia al efecto que puede tener la composición de las muestras clínicas de esputo, en la detección del Ag38kDa de *Mtb*, usando un ensayo ELISA competitivo estandarizado bajo condiciones controladas en el laboratorio.

## 2 METODOLOGÍA

### 2.1 Materiales y reactivos

Para el desarrollo del inmunoensayo tipo ELISA competitivo se utilizó: el biomarcador de Tb, antígeno Ag38kDa como antígeno estándar, fabricado por la empresa MyBioSource y el anticuerpo primario monoclonal Myc-31, obtenido durante el desarrollo de la tesis de doctorado de la PhD Marisol Jaramillo Grajales, en la Universidad Politécnica de Valencia. El reactivo revelador escogido fue el anticuerpo secundario de conejo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano - HRPO (Horseradish peroxidase) de la marca Abcam (Tijssen, 1985) (Price & Newman, 1991).

Las soluciones utilizadas en el desarrollo del inmunoensayo fueron: Tampón Carbonato (Carbonato 50mM pH 9.6), Tampón PBST (Tampón fosfato con 0.05% de Tween 20), Solución de revelado (Citrato sódico 25mM, fosfato sódico 62mM pH 5.35, OPD – o-fenilenodiamina 20mg/10mL, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4μL/10mL), Solución de parada: ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25M). Los reactivos que se utilizaron para preparar las soluciones fueron de la marca Sigma. Para el desarrollo y lectura del inmunoensayo ELISA fueron empleados Placa de microtitulación para ELISA de 96 pozos de poliestireno de fondo plano (marca Corning), Lavador automático Wellwash (marca Thermo Scientific) y Lector Multiskan FC marca Thermo Scientific.

### 2.2 PROCEDIMIENTO

#### 2.2.1 ELISA BIDIMENSIONAL INDIRECTO

En la fase de desarrollo de un inmunoensayo cuantitativo por competición, se deben ajustar las cantidades de anticuerpo y antígeno, con el objetivo de optimizar las concentraciones adecuadas para su utilización, debido a que, en el caso donde el anticuerpo principal o la muestra se encuentren muy concentrados, se corre el riesgo de saturar el ensayo y detectar falsos positivos. Por el contrario, si estos no se encuentran lo suficientemente concentrados, la señal obtenida será poca y esto dificultará su posterior detección. Por lo anterior, es indispensable encontrar un balance entre las concentraciones de los reactivos usados para la detección de un analito en el formato competitivo. Para ello, lo más recomendable es el diseño e implementación de un ensayo de titulación, en este caso un ELISA bidimensional indirecto, el cual consiste en probar diferentes concentraciones del anticuerpo y el antígeno simultáneamente (Boster, 2017) (Thermo Fisher Scientific, n.d.-a) (Brady, 1995).

Para el ensayo bidimensional se siguió el protocolo descrito en (Jaramillo, 2016). Un ensayo ELISA bidimensional indirecto está compuesto por las siguientes etapas: i) tapizado del antígeno estándar a diferentes concentraciones, ii) lavado, iii) incubación con el anticuerpo primario a diferentes concentraciones y lavado, iv) incubación con el anticuerpo secundario y lavado, v) revelado de la reacción de detección del inmunocomplejo y vi) lectura de la

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

reacción colorimétrica. Estas etapas se describen con mayor detalle en el esquema de la Figura 7.

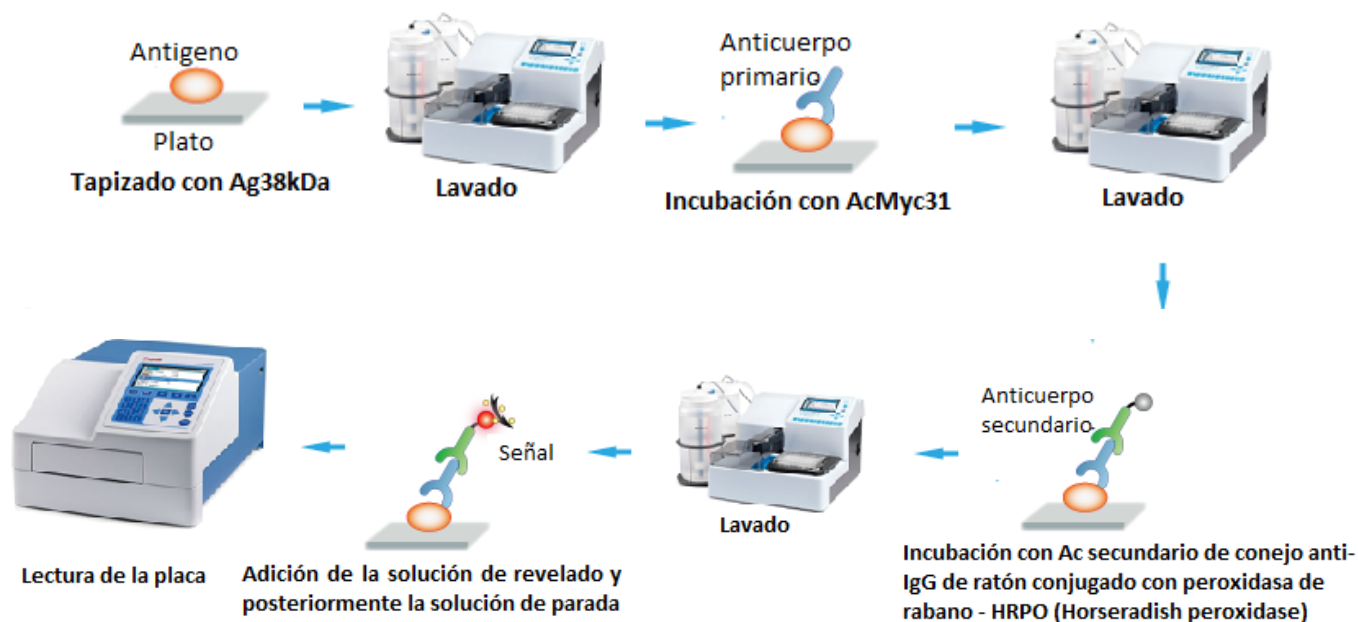


Figura 7 Secuencia de pasos para la detección del anticuerpo Myc31 por medio de una ELISA bidimensional indirecta (Creative Diagnostics, n.d.) (Thermo Fisher Scientific, n.d.-c) (Thermo Fisher Scientific, n.d.-b)

### 2.2.1.1 Tapizado

Para inmovilizar el antígeno 38kDa en el fondo de la placa de micro titulación, se adicionó a cada pozo 100  $\mu$ L de Ag38kDa en tampón carbonato pH 9,6 por duplicado. Las diferentes concentraciones del antígeno fueron dispensadas en la placa de derecha a izquierda, comenzando por la menor concentración y aumentando de concentración gradualmente de acuerdo con el factor de dilución seleccionado. Para este ensayo se utilizó un factor de dilución 3, comenzando con una concentración de 1  $\mu$ g/mL del antígeno Ag38kDa y seguido de las concentraciones aproximadas: 0,33 $\mu$ g/mL, 0,11  $\mu$ g/mL, 0,04 $\mu$ g/mL, 0,012 $\mu$ g/mL y 0,004 $\mu$ g/mL. En este punto la placa se almacenó durante toda la noche a 4 °C (puede ser almacenada hasta un mes protegida de la luz) (Figura 8).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.



Figura 8. Placa almacenada a 4°C

#### 2.2.1.2 Lavado del antígeno tapizado

Al día siguiente, se realiza el lavado de la placa con el fin de retirar las moléculas que no se adhirieron al fondo de los pozos de la placa. Para el lavado, se posicionó la placa en el lavador automático Wellwash (Thermo Scientific) y se realizaron tres lavados de 500  $\mu$ L con PBST 0,05% preparado fresco y a temperatura ambiente. Al finalizar el lavado se retiró el remanente de solución de lavado, golpeando en seco sobre papel adsorbente.

#### 2.2.1.3 Incubación con el anticuerpo primario AcMyc31

Posterior al lavado, se realizó la incubación del anticuerpo primario durante una hora a temperatura ambiente. Para ello se adiciona a cada pozo 100  $\mu$ L de AcMyc31 en solución PBST 0,05%. Las diferentes concentraciones de anticuerpo se adicionaron de arriba a abajo, comenzando por la menor concentración y aumentando de concentración gradualmente de acuerdo al factor de dilución. Las concentraciones aproximadas de AcMyc31 utilizadas fueron: 1  $\mu$ g/mL, 0,33  $\mu$ g/mL, 0,11  $\mu$ g/mL, 0,04  $\mu$ g/mL, 0,012  $\mu$ g/mL y 0,004  $\mu$ g/mL (Gan & Patel, 2013b).

#### 2.2.1.4 Lavado del anticuerpo primario

Finalizada la incubación con Myc31, se realizó un lavado con el fin de retirar las moléculas del anticuerpo primario que no se unieron a las moléculas de Ag38kDa que se encontraban adheridas al fondo de la placa. Para el lavado se posicionó la placa en el lavador automático Wellwash (Thermo Scientific) y se realizaron tres lavados de 500  $\mu$ L con PBST 0,05%. Al finalizar el lavado se retiró el remanente de solución de lavado, golpeando en seco sobre papel.

#### 2.2.1.5 Incubación con el anticuerpo secundario conjugado con HRPO

Para detectar la formación de los inmunocomplejos, se adicionó a cada pozo 100  $\mu$ L de la solución del anticuerpo secundario de conejo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rabano - HRPO (Horseradish peroxidase) fabricado por Abcam a una concentración de

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.



1  $\mu\text{L}$  por cada 10 mL de solución PBST 0,05%. La reacción de detección se dejó actuar durante una hora a temperatura ambiente (Gan & Patel, 2013b).

#### 2.2.1.6 Lavado del anticuerpo secundario

Finalizada la reacción de detección de los inmunocomplejos, se realizaron nuevamente tres lavados de 500  $\mu\text{L}$  con PBST 0,05% recién preparado y a temperatura ambiente, con el fin de retirar el exceso de anticuerpo secundario no unido. Al finalizar el lavado se retiró el remanente de solución de lavado, golpeando en seco sobre papel.

#### 2.2.1.7 Revelado

Para detectar la formación de inmunocomplejos en el fondo de cada pozo de la placa, se adicionó una solución de 20 mg de OPD + 4  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  en 10 mL del tampón de revelado (citrato sódico 25 mM, fosfato sódico 62 mM, pH 5,35 (469 mL  $\text{H}_2\text{O}$  + 31 mL PBS 10X + 3,68 g ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ))). Con el propósito de obtener una señal colorimétrica detectable, se adicionó  $\text{H}_2\text{O}_2$ , un aceptor de electrones, que cataliza la oxidación del compuesto OPD. Este compuesto oxidado absorbe a 490 nm lo que ocasiona la coloración de los pozos en los cuales se presentó la ligación del Ac secundario conjugado a los inmunocomplejos (Figura 9). El tiempo de reacción para el revelado fue de 10 minutos a temperatura ambiente.

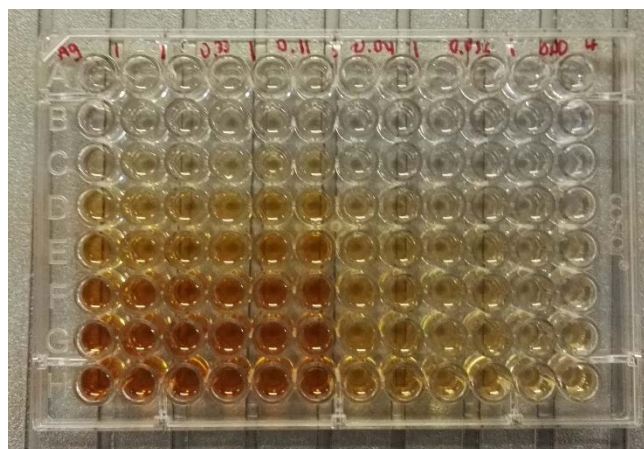


Figura 9. Placa de micro titulación luego de agregar la solución de revelado

#### 2.2.1.8 Parada

Con el fin de detener el efecto de la solución de revelado y evitar la saturación colorimétrica de los pozos, se adicionó a cada pozo 100  $\mu\text{L}$  de solución de parada (ácido sulfúrico 2,5 M (433,37 mL  $\text{H}_2\text{O}$  + 66,63 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (95%))). La lectura de la placa se realizó en el menor tiempo posible posterior a la adición de la solución de parada. Se usó el lector de ELISA (Multiskan FC) en medida diferencial 491 – 648 nm (Figura 10).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.



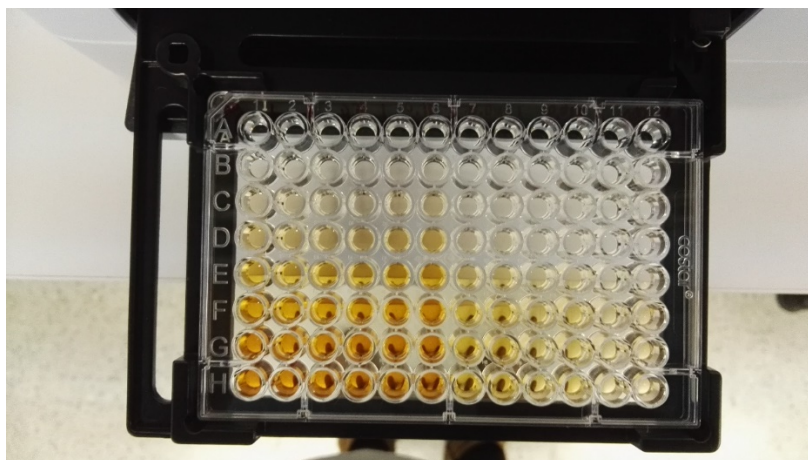


Figura 10. Placa de ELISA en el Multiskan FC luego de agregar solución de parada

## 2.2.2 Modelo para estimar la señal máxima de un ensayo ELISA bidimensional indirecto

Con el fin de estandarizar un ensayo ELISA competitivo para detección de biomarcadores de enfermedades infecto-contagiosas, es necesario el desarrollo de ensayos preliminares que permitan ajustar las condiciones de los inmunoreactivos que serán usados como base para la reacción de competición.

Estos ensayos previos por lo general son ensayos ELISA bidimensional, los cuales permiten determinar parejas de antígeno – anticuerpo que proporcionen señales de absorbancia, entre 1 y 2 Abs (unit). Sin embargo, estos ensayos requieren del *screening* de rangos amplios de concentraciones de antígeno y anticuerpo estándar, lo que implica un gasto elevado de reactivos, que por lo general son de alto costo, además del tiempo de realización de los ensayos que pueden ser requeridos en duplicada o triplicada.

Considerando lo anterior, se propone un modelo fenomenológico de base semi-física para la estimación de los valores de absorbancia máxima de un ensayo ELISA bidimensional indirecto.

### 2.2.2.1 Sistema de procesos

El sistema de procesos está representado por el pozo de la placa de microtitulación y la cantidad de moléculas que son dispensadas en el mismo, con el objetivo de detectar un analito a partir de la formación de un inmunocomplejo.

Durante el proceso de detección del analito, se realizan lavados para descartar el exceso de moléculas que no forman parte de la reacción en cada una de las diversas etapas del proceso. La presencia del inmunocomplejo en los pozos es detectada por una reacción [La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.](#)

colorimétrica, en respuesta a la oxidación del sustrato, por la enzima catalizadora conjugada con el anticuerpo secundario. Durante la detección, el anticuerpo secundario conjugado reconoce y se une al inmunocomplejo formando parte de él. Posteriormente, la respuesta colorimétrica generada es cuantificada en un espectrofotómetro que detecta el haz de energía transmitida por cada uno de los pozos (Jaramillo, 2016).

Para efectos de desarrollo del modelo, es necesario aclarar que durante la realización de este ensayo algunas moléculas son sometidas a cambios de temperatura.

### 2.2.2.1.1 Aplicación de la ley de conservación

Para el **Sistema de procesos**, el balance total de masa y el balance de energía son los siguientes:

#### 2.2.2.1.1.1 Balance total de masa

El balance total de masa está definido por las moléculas que son dispensadas en el pozo de la placa, y las moléculas que son descartadas luego de los lavados. El balance total de masa es como se muestra:

$$\frac{d(\delta_{1,t1} m_1 + \delta_{2,t2} m_2 + \delta_{3,t3} m_3 + \delta_{4,t4} m_4)}{dt} = \delta_{1,t1} \dot{m}_1 + \delta_{2,t2} \dot{m}_2 + \delta_{3,t3} \dot{m}_3 + \delta_{4,t4} \dot{m}_4 - \delta_{5,t5} \dot{m}_5 - \delta_{6,t6} \dot{m}_6 - \delta_{7,t7} \dot{m}_7 + \delta_{8,t8} \dot{m}_8$$

$\dot{m}_1$ : Tasa de aporte de masa de Antígeno Tapizado

$\dot{m}_2$ : Tasa de aporte de masa del Anticuerpo primario

$\dot{m}_3$  : Tasa de aporte de masa del Anticuerpo secundario conjugado con enzima

$\dot{m}_4$ : Tasa de aporte de masa del sustrato de la enzima

$\dot{m}_5$ : Tasa de pérdida de masa del Antígeno Tapizado que no se adhiera al pozo

$\dot{m}_6$ : Tasa de pérdida de masa del Anticuerpo primario

$\dot{m}_7$ : Tasa de pérdida de masa del Anticuerpo secundario conjugado con enzima que no se adhiere al inmunocomplejo

$\dot{m}_8$ : Tasa de aporte de masa de la solución de parada que se encarga de detener la oxidación del sustrato

Debido al volumen constante en los pozos donde se encuentran las moléculas, la ecuación anterior se puede expresar como:

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

$$\frac{d(\delta_{1,t1} m_1 + \delta_{2,t2} m_2 + \delta_{3,t3} m_3 + \delta_{4,t4} m_4)}{dt} = 0$$

*Ecuación 5. Balance de masa*

### **2.2.2.1.1.2 Balance total de energía**

El balance total de energía está definido por la energía entregada por el espectrofotómetro a la placa ( $W_e$ ) y la energía transmitida por las moléculas de la placa luego de recibir la energía incidente ( $W_s$ ). Este balance se puede representar como:

$$E = W_e - W_s$$

*Ecuación 6. Balance total de energía*

Sin embargo, dado que la tasa de energía transmitida, es función de la misma cantidad de energía transmitida, el modelo básico es de la forma:

$$\frac{\partial W_s}{\partial C_2} \propto W_s$$

Cuando las concentraciones de anticuerpo son bajas, la tasa de energía transmitida es positiva, debido a que no existen muchos electrones libres que interactúen entre moléculas y que por lo tanto puedan bloquear la salida de los electrones transmitidos. Por el contrario, cuando las concentraciones de anticuerpo son altas, la tasa de energía transmitida es negativa, debido a la sobre saturación de electrones en la superficie que se interponen en el camino libre del haz de electrones transmitido.

Debido a lo anterior la tasa de energía transmitida cuando las concentraciones de anticuerpo son bajas se puede representar de la siguiente manera:

$$\frac{\partial W_s}{\partial C_2} = \lambda_1 W_s$$

Donde  $W_s$  es la energía transmitida,  $C_2$  es la concentración de anticuerpo y  $\lambda$  es una constante de proporcionalidad.

De igual manera la tasa de energía transmitida cuando las concentraciones de anticuerpo son altas se puede representar de la siguiente manera:

$$\frac{\partial W_s}{\partial C_2} = -\lambda_2 W_s$$

Donde  $W_s$  es la energía transmitida,  $C_2$  es la concentración de anticuerpo y  $\lambda$  es una constante de proporcionalidad.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

De esta forma, el arquetipo del modelo requiere que para valores pequeños de concentración de anticuerpo sea una curva cóncava hacia arriba, y para valores grandes de concentración de anticuerpo sea una curva cóncava hacia abajo. Que se puede representar de la siguiente manera para las concentraciones inferiores:

$$E = W_i - W_s e^{\lambda_1 c_2}$$

Y de la siguiente manera para las concentraciones superiores:

$$E = W_i - W_s e^{-\lambda_2 c_2}$$

Debido a que este modelo tiene como fin último hallar las señales máximas para la curva obtenida al realizar un ensayo con una determinada concentración de antígeno tapizado vs diferentes concentraciones de anticuerpo primario, se utilizará el arquetipo de modelo que se planteó anteriormente para los valores mayores de concentración de anticuerpo, debido a que actualmente no contamos con el valor exacto en el cual la curva cambia de concavidad, y por tanto no es posible definir actualmente para este trabajo a partir de qué punto los valores serían considerados como bajas concentraciones de anticuerpo. Por lo anterior, la ecuación para encontrar el valor de la energía transmitida es la siguiente:

$$W_s = \frac{W_i - E}{e^{-\lambda_1 c_2}}$$

Para poder calcular E, se debe tener en cuenta que la temperatura de las moléculas durante el ensayo no es constante, dado que: los reactivos son almacenados en un rango de -20°C a 4°C, la placa con el antígeno tapizado debe permanecer a 4°C durante una noche y luego se deja a temperatura ambiente, se debe tener en cuenta los cambios en la energía térmica del sistema. También se debe tener en cuenta la energía generada por las interacciones entre moléculas y entre molécula – sustrato. Por último, debido a que la enzima conjugada al anticuerpo secundario propicia la oxidación del sustrato (en este caso la OPD), se debe tener en cuenta la energía que se genera de esta reacción. De esta forma, la energía en los pozos de la placa se puede representar como:

$$E = \delta_{t1} W_t - \delta_{t4} W_R + \delta_{t4} W_{tp}$$

*Ecuación 7. Balance de energía en los pozos de la placa*

Donde  $W_t$  es la energía térmica entregada,  $W_{tp}$  es la energía térmica resultante de interacciones entre moléculas,  $W_R$  es la tasa de pérdida luego de la oxidación.

## 2.2.2.1.2 Ecuaciones constitutivas

### 2.2.2.1.2.1 Masa

Si la ecuación 5 es expresada en términos de concentración, la ecuación quedaría como se muestra a continuación:

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

$$\frac{d(\delta_{t=0} V_1 C_1 + \delta_{t=1} V_2 C_2 + \delta_{t=2} V_3 C_3 + \delta_{t=3} V_4 C_4)}{dt} = 0 \quad (3)$$

Donde  $V_n$  hace referencia al volumen del solvente en el cual se encuentra la  $n_{ecima}$  molécula, y  $C_n$  corresponde a la concentración de la  $n_{ecima}$  molécula.

## 2.2.2.1.2.2 Energía

### 2.2.2.1.2.2.1 Energía térmica

$\dot{W}_t$  es el cambio de temperatura de las moléculas durante el ensayo y puede ser expresado como:

$$W_t = \delta_{t\alpha} C_{p1} C_1 V_1 \Delta T + \delta_{t\alpha} C_{p2} S_2 A_2 \Delta T_1 + \delta_{t\alpha} C_{p3} S_3 A_3 \Delta T_2$$

$$W_t = \delta_{t\alpha} C_{p1} C_1 V_1 T + \delta_{t\alpha} C_{p2} S_2 A_2 T_1 + \delta_{t\alpha} C_{p3} S_3 A_3 T_2$$

Donde  $C_{pn}$  es el calor específico de la  $n_{ecima}$ ,  $C_n$  es la concentración de la  $n_{ecima}$  molécula a la cual se le induce el cambio de temperatura,  $V_n$  es el volumen del solvente en el cual se encuentra la molécula,  $\delta_{ti}$  es la función delta de Dirac para las moléculas en el tiempo  $\alpha$  y  $T_n$  es el cambio de temperatura al cual es sometida la  $n_{ecima}$  molécula.

También se presenta una reacción térmica, resultado de la formación del inmunocomplejo y de la interacción de las moléculas con la superficie del pozo, la cual es descrita por la siguiente ecuación:

$$\dot{W}_t = \delta_{t\alpha} C_{p1} C_1 V_1 \Delta T_1 + \delta_{t\alpha} C_{p2} S_2 A_2 \Delta T_2 + \delta_{t\alpha} C_{p3} S_3 A_3 \Delta T_3$$

Donde  $\delta_{ti}$  es la función delta de Dirac para las moléculas en el tiempo  $\alpha$ ,  $C_{pi}$  es el calor específico relacionado a la masa de la molécula  $n$ ,  $S_i$  es la concentración de la molécula por el área superficial,  $A_n$  es el área superficial del pozo,  $T_n$  es el cambio de temperatura del sistema cuando ocurren las reacciones,  $C_n$  es la concentración de la  $n_{ecima}$  molécula,  $V_n$  es el volumen del solvente en el cual se encuentra la molécula.

De acuerdo a Nygren, H & Stenberg, M ( 1985), de la ley de difusión de Fick's Law se puede concluir que para la interacción entre antígeno – anticuerpo la concentración de la molécula por área superficial es:

$$S = \frac{2}{\sqrt{\pi}} C_0 \sqrt{Dt}$$

Donde  $C_0$  es la concentración de la molécula en solución introducida en un tiempo ( $t$ ) y  $D$  es la constante de difusión de las moléculas.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

### 2.2.2.1.2.2.2 Energía Lumínica

$\dot{W}_H$  es la energía producida por el espectrofotometro al arrojar el haz de luz sobre la muestra con el objetivo de identificar la presencia o ausencia del inmunocomplejo, y es definido como:

$$\dot{W}_H = hf_e$$

Donde  $h$  es la constante de Planck and  $f_e$  es la frecuencia del haz de luz que entra a cada pozo de la placa de microtitulación.

### 2.2.2.1.2.2.3 Energía de la reacción de óxido - reducción

$\dot{W}_R$  representa la energía resultante de la reacción de óxido reducción entre la enzima y el  $H_2O_2$  con el sustrato. De acuerdo con Liu et al. (Liu, Wang, Liu, Xiao, & Wang, 2006) puede ser expresado como:

$$\Omega_{Max} = \Omega_0 \left( 1 + \frac{K_{m,S}}{[S_0]} + \frac{K_{m,H_2O_2}}{[H_2O_2]_0} \right)$$

Donde  $\Omega_{Max}$  es el calor máximo producido en un tiempo,  $\Omega_0$  es el calor producido en un tiempo 0,  $K_{m,S}$  es la constante de Michaelis para el HRP (enzima) en relación con el sustrato,  $K_{m,H_2O_2}$  es la constante de Michaelis para el HRP (enzima) en relación con el  $H_2O_2$ ,  $S_0$  es el sustrato reducido en un tiempo inicial y  $[H_2O_2]_0$  es la concentración de  $H_2O_2$  en un tiempo inicial.

Cuando cada una de las ecuaciones constitutivas es reemplazada en la ecuación 6, se llega al siguiente resultado:

$$E = (\delta_{t\alpha} C_{p1} C_1 V_1 T + \delta_{t\alpha} C_{p2} S_2 A_2 T_1 + \delta_{t\alpha} C_{p3} S_3 A_3 T_2 - \delta_{t\alpha} C_{p1} C_1 V_1 \Delta T_1 - \delta_{t\alpha} C_{p2} S_2 A_2 \Delta T_2 - \delta_{t\alpha} C_{p3} S_3 A_3 \Delta T_3 - \Omega_0 \left( 1 + \frac{K_{m,S}}{[S_0]} + \frac{K_{m,H_2O_2}}{[H_2O_2]_0} \right))$$

$$hf_e - e^{-\lambda_1 C_2} W_s = (\delta_{t\alpha} C_{p1} C_1 V_1 T + \delta_{t\alpha} C_{p2} S_2 A_2 T_1 + \delta_{t\alpha} C_{p3} S_3 A_3 T_2 - \delta_{t\alpha} C_{p1} C_1 V_1 \Delta T_1 - \delta_{t\alpha} C_{p2} S_2 A_2 \Delta T_2 - \delta_{t\alpha} C_{p3} S_3 A_3 \Delta T_3 - \Omega_0 \left( 1 + \frac{K_{m,S}}{[S_0]} + \frac{K_{m,H_2O_2}}{[H_2O_2]_0} \right))$$

$W_s$

$$= \frac{hf_e - ((\delta_{t\alpha} C_{p1} C_1 V_1 T + \delta_{t\alpha} C_{p2} S_2 A_2 T_1 + \delta_{t\alpha} C_{p3} S_3 A_3 T_2 - \delta_{t\alpha} C_{p1} C_1 V_1 \Delta T_1 - \delta_{t\alpha} C_{p2} S_2 A_2 \Delta T_2 - \delta_{t\alpha} C_{p3} S_3 A_3 \Delta T_3 - \Omega_0 \left( 1 + \frac{K_{m,S}}{[S_0]} + \frac{K_{m,H_2O_2}}{[H_2O_2]_0} \right)))}{e^{-\lambda_1 C_2}}$$

Debido a que se tiene el valor de  $\Omega_{Max}$ , se utilizará este valor directamente, por lo cual la ecuación quedaría de la siguiente manera:

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

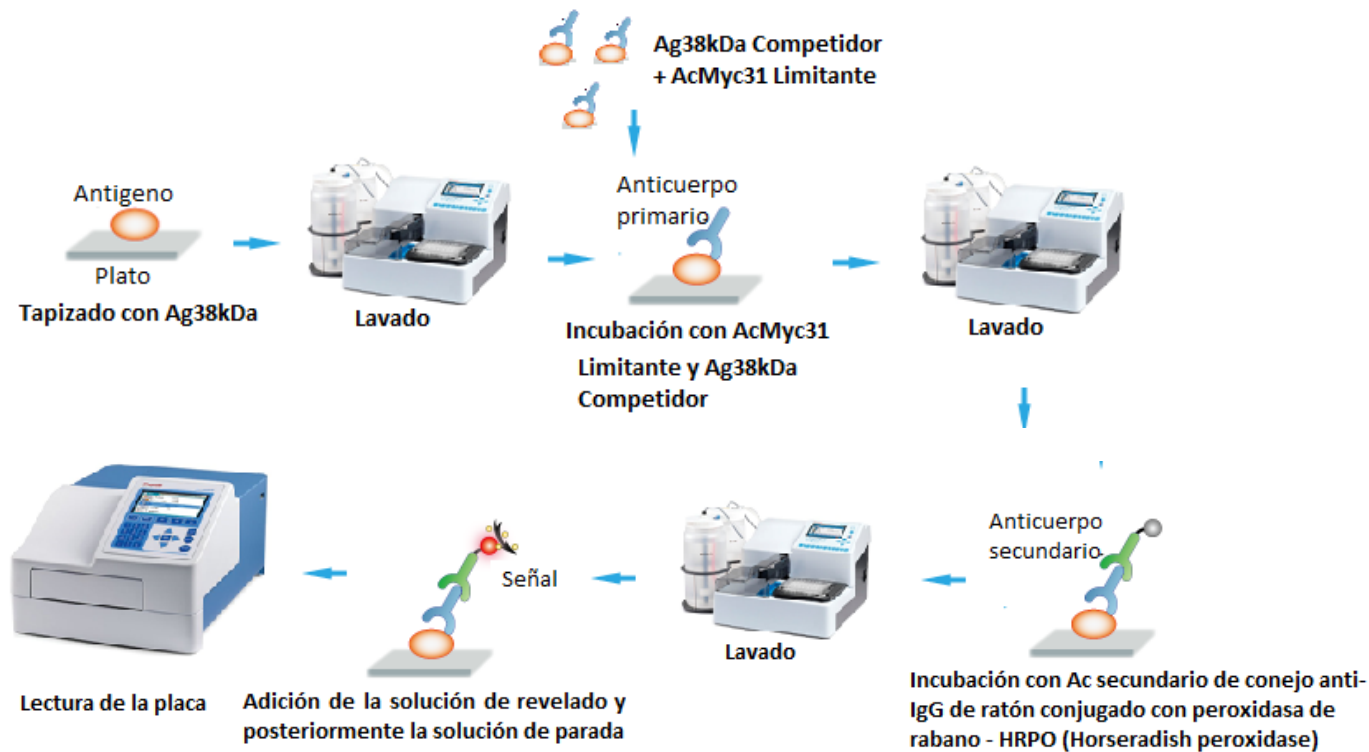
$$W_s = \frac{hf_e - (\delta_{ta}C_{p1}C_1V_1T + \delta_{ta}C_{p2}S_2A_2T_1 + \delta_{ta}C_{p3}S_3A_3T_2 - \delta_{ta}C_{p1}C_1V_1\Delta T_1 - \delta_{ta}C_{p2}S_2A_2\Delta T_2 - \delta_{ta}C_{p3}S_3A_3\Delta T_3 - \Omega_{Max})}{e^{-\lambda_1 C_2}}$$

Ecuación 8. Ecuación del modelo para estimar la señal máxima de un ensayo ELISA bidimensional indirecto

### 2.2.3 ELISA COMPETITIVA

En la fase de desarrollo de un inmunoensayo, se debe realizar un ajuste en las cantidades usadas de antígeno y anticuerpo con el fin de optimizar el ensayo al punto de tener una alta sensibilidad para la detección del analito en cuestión (Brady, 1995).

Para la obtención de la curva de calibración del ensayo ELISA competitivo se siguió el protocolo descrito en (Jaramillo, 2016). Las etapas del ensayo se esquematizan en la Figura 11 y se describen con mayor detalle a continuación:



La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Figura 11. Secuencia de pasos para la detección de Ag38kDa por medio de una ELISA competitiva indirecta (Creative Diagnostics, n.d.) (Thermo Fisher Scientific, n.d.-d) (Thermo Fisher Scientific, n.d.-c)

### 2.2.3.1 Tapizado

En esta etapa se inmoviliza en el fondo de cada pozo las concentraciones de Ag38kDa encontradas en el ensayo bidimensional. Para ello se adicionó 100  $\mu$ L del antígeno en tampón de carbonato pH 9,6 a las concentraciones de 0,05  $\mu$ g/mL, 0,03  $\mu$ g/mL y 0,012  $\mu$ g/mL, conforme se muestra en el diseño de la Tabla 1. Posterior a esto, la placa fue almacenada durante toda la noche a 4 °C.

Tabla 1. Esquema de distribución de concentraciones de Ag38kDa en los pozos de la placa de micro titulación.

Ag38kDa	0,05	0,03	0,03	0,012	0,03	0,03

### 2.2.3.2 Incubación de la mezcla Ag Competidor + Ac monoclonal primario limitante

Posterior al lavado de la placa para retirar el excedente de antígeno que no fue inmovilizado, fue adicionado 50  $\mu$ L del antígeno competidor, en este caso el mismo Ag38kDa estándar en solución PBST 0,05%. Con el propósito de obtener una curva de calibración competitiva de los antígenos (tapizado y en solución) por el anticuerpo, el antígeno competidor se adiciona a diferentes concentraciones comenzando en 10  $\mu$ g/mL factor de dilución 5: 2  $\mu$ g/mL, 0,4  $\mu$ g/mL, 0,08  $\mu$ g/mL, 0,0016  $\mu$ g/mL, 0,0032  $\mu$ g/mL, 0,00064  $\mu$ g/mL, 0,000128  $\mu$ g/mL (Tabla 6). Luego se adicionó a todos los pozos 50  $\mu$ L del Ac Myc31 en PBST 0,05% a las concentraciones encontradas en el ensayo bidimensional de 0,05  $\mu$ g/mL, 0,03  $\mu$ g/mL y 0,0012  $\mu$ g/mL (Tabla 2). La mezcla se homogeneizó suavemente con movimientos circulares de la placa para combinar los reactivos y facilitar la competición. La reacción de

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.



competición fue incubada durante una hora a temperatura ambiente, cubriendo la placa con papel aluminio.

*Tabla 2. Esquema de las concentraciones del anticuerpo monoclonal limitante y el Ag competidor en los pozos del plato de ELISA.*

Ag38kDa/Ag38kDa	0,05	0,03	0,03	0,012	0,03	0,03
0,000128						
0,00064						
0,0032						
0,016						
0,08						
0,4						
2						
10						
Myc31	0,05	0,05	0,03	0,03	0,03	0,012

### **2.2.3.3 Incubación con el anticuerpo secundario conjugado con HRPO**

Luego de realizar el lavado para retirar el exceso de reactivos que no se adhirieron con el complejo al fondo de los pozos, se realizó la incubación de la placa con el anticuerpo secundario de conejo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano - HRPO (Horseradish peroxidase) fabricado por Abcam (1  $\mu$ L/10 mL) en PBST 0,05%, durante una hora a temperatura ambiente (Gan & Patel, 2013b). Previo a la reacción de revelado, fueron realizados nuevamente tres lavados de 500  $\mu$ L con PBST 0,05% recién preparado y a temperatura ambiente, con el fin de retirar el exceso de los reactivos que no formaron inmunocomplejos.

### **2.2.3.4 Revelado y parada de la reacción colorimétrica**

Para el revelado, se adicionó una solución de 20 mg de OPD/ 10 mL + 4  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/10 mL en tampón de revelado (citratato sódico 25 mM, fosfato sódico 62 mM, pH 5,35 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 31 mL PBS 10X + 3,68 g (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> \* 2H<sub>2</sub>O)). Se adicionó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un aceptor de electrones, que cataliza la oxidación del compuesto OPD, con el propósito de obtener una señal colorimétrica detectable. Este compuesto oxidado absorbe a 490 nm lo que ocasiona la coloración de los pozos en los cuales se presentó la ligación del Ac secundario conjugado

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.



A continuación, se presenta el diseño final de la placa ELISA, donde se presentan las diferentes concentraciones de antígeno Ag38kDa, Ag competidor (Ag38kDa) y anticuerpo Myc31 monoclonal limitante que fueron chequeadas por columnas y filas, respectivamente. Se debe aclarar que las concentraciones de tapizado se realizaron por duplicado.

Ag38kDa Competidor/Ag38kDa	0,05	0,03	0,03	0,012	0,03	0,03
0,000128						
0,00064						
0,0032						
0,016						
0,08						
0,4						
2						
10 / Myc31	0,05	0,05	0,03	0,03	0,03	0,004

## 2.2.4 ENSAYOS DE REPETIBILIDAD PRELIMINAR PARA LA SELECCIÓN DE LA MEJOR CURVA DE CALIBRACIÓN DE UN ENSAYO ELISA COMPETITIVO

Con el fin de determinar la curva de calibración más adecuada para ser utilizada como curva de referencia de un ensayo ELISA competitivo estándar, se realizaron una serie de ensayos con réplicas de las parejas anticuerpo – antígeno (0,05 – 0,03), (0,03 – 0,03) y (0,03 – 0,012), que fueron las mejores curvas obtenidas del ensayo anterior. A continuación, se describen las etapas que se siguieron:

### 2.2.4.1 Tapizado

Para este ensayo de repetibilidad preliminar se utilizaron dos placas de microtitulación. En una de las placas se adicionó 100  $\mu$ L del Ag38kDa las concentraciones de 0,03  $\mu$ g/mL y 0,012  $\mu$ g/mL y en la otra placa se adicionó 100  $\mu$ L del Ag38kDa con la concentración de 0,03  $\mu$ g/mL. Luego de esto, las placas fueron almacenadas durante toda la noche a 4 °C.

### 2.2.4.2 Incubación de la mezcla Ag Competidor + Ac monoclonal primario limitante

Para la primera placa se adicionaron 50  $\mu$ L del antígeno competidor Ag38kDa en solución PBST 0,05% a cada uno de los pozos de la placa, con cuidado de no tocar el fondo y con precaución de no tocar las paredes de los pozos. El Ag competidor se adiciona conforme los ensayos anteriores y como se muestra en la tabla 10. Posteriormente, se adicionó a todos los pozos 50  $\mu$ L del Ac Myc31 en PBST 0,05% con las concentraciones respectivas (Tabla 4 y 5). Tras la homogenización con movimientos circulares de la placa, la mezcla fue incubada durante una hora a temperatura ambiente, cubriendo la placa con papel aluminio.

*Tabla 4. Esquema de las concentraciones del anticuerpo monoclonal limitante y el Ag competidor en los pozos del plato de ELISA 1*

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Ag38kDa/Ag38kDa	0.03	0.03	0.03	0.012	0.012	0.012
0.000128						
0.00064						
0.0032						
0.016						
0.08						
0.4						
2						
10						
Myc31	0.05	0.05	0.05	0.012	0.012	0.012

*Tabla 5. Esquema de las concentraciones del anticuerpo monoclonal limitante y el Ag competidor en los pozos del plato de ELISA 2.*

Ag38kDa/Ag38kDa	0.03	0.03	0.03
0.000128			
0.00064			
0.0032			
0.016			
0.08			
0.4			
2			
10			

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Myc31	0.03	0.03	0.03
-------	------	------	------

#### **2.2.4.3 Incubación con el anticuerpo secundario conjugado con HRPO**

Posterior al lavado de las placas fueron adicionados 100  $\mu$ L de la solución del anticuerpo secundario de conejo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano - HRPO (Horseradish peroxidase) fabricado por Abcam (1 $\mu$ L/10 mL) en PBST 0,05%. La reacción de detección se dejó actuar durante una hora a temperatura ambiente (Gan & Patel, 2013b).

Previo a la reacción de revelado, fueron realizados nuevamente tres lavados de 500  $\mu$ L con PBST 0,05% recién preparado y a temperatura ambiente, con el fin de retirar el exceso de los reactivos que no formaron inmunocomplejos.

#### **2.2.4.4 Revelado y parada de la reacción colorimétrica**

Para el revelado de la formación de inmunocomplejos, se adicionó una solución de 20 mg de OPD/ 10 mL + 4  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/10 mL en tampón de revelado (citrato sódico 25 mM, Fosfato sódico 62 mM, pH 5,35 (469 mL H<sub>2</sub>O + 31 mL PBS 10X + 3,68 g (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> \* 2H<sub>2</sub>O)) a cada placa (Figura 13). El tiempo de reacción para el revelado fue de 10 minutos a temperatura ambiente. Con el fin de detener el efecto de la solución de revelado y evitar la saturación colorimétrica de los pozos, se adicionó a cada pozo 100  $\mu$ L de solución de parada (ácido sulfúrico 2,5 M (433,37 mL H<sub>2</sub>O + 66,63 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (95%))). La lectura de la placa se realizó en el menor tiempo posible posterior a la adición de la solución de parada. Se usó el lector de ELISA (Multiskan FC) en medida diferencial 491-648 nm.



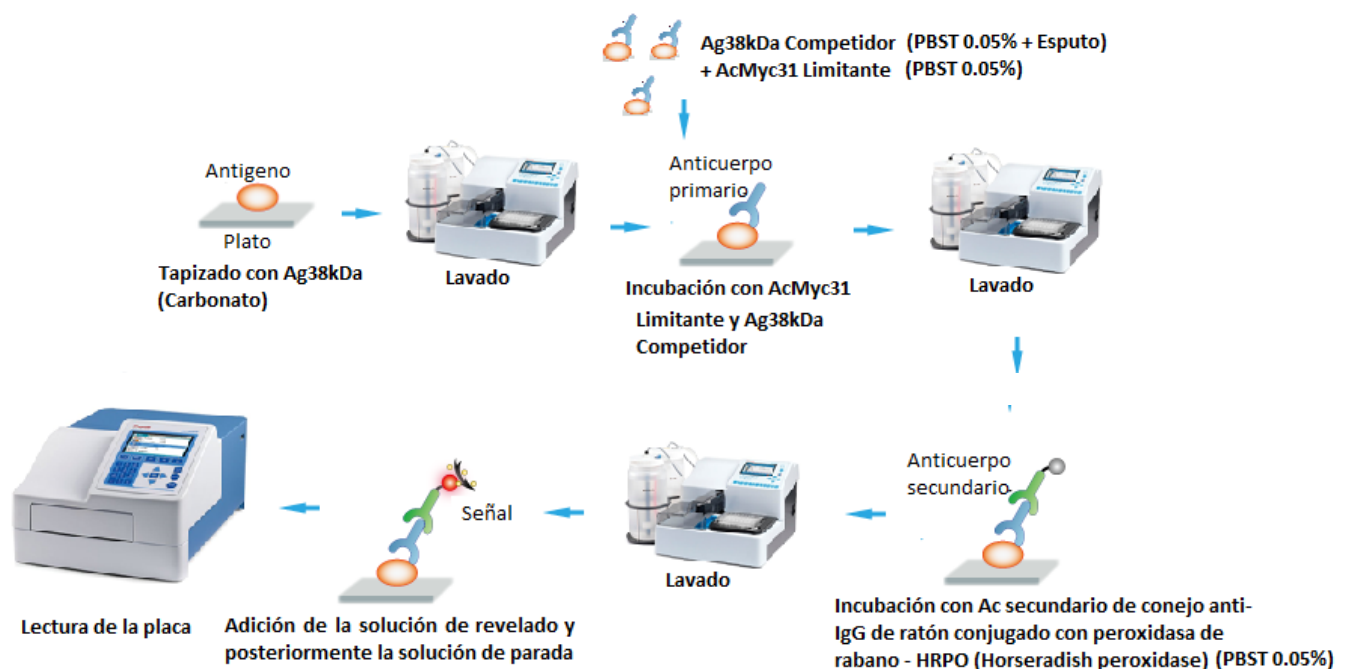


Figura 14. Secuencia de pasos para la detección de Ag38kDa en muestras clínicas por medio de una ELISA competitiva indirecta (Creative Diagnostics, n.d.) (Thermo Fisher Scientific, n.d.-d) (Thermo Fisher Scientific, n.d.-c)

### 2.2.5.1 Tapizado

De los ensayos anteriores se selecciona como curva de calibración estable y repetible la que se obtiene al utilizar las parejas de reactivos (0,03-0,012)  $\mu\text{g/mL}$  de anticuerpo y antígeno, respectivamente. Para el tapizado de la placa, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de Ag38kDa a cada pozo en tampón de carbonato pH 9,6 a una concentración de 0,012  $\mu\text{g/mL}$  (Tabla 11).

### 2.2.5.2 Incubación de la mezcla Ag Competidor + Ac monoclonal primario limitante

Al día siguiente la placa fue lavada y se procedió a adicionar la mezcla Ag competidor + anticuerpo limitante para la reacción de competición con el Ag en los pozos como en los casos anteriores. Sin embargo, en este caso el solvente del Ag competidor o Ag38kDa estándar, sería una dilución de muestras de esputo en PBST 0,05% como se muestra en la tabla 15 (1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:100). Dichos solventes o diluciones de las muestras de esputo fueron posteriormente contaminadas con el Ag competidor, el cual se adicionó a diferentes concentraciones como en los ensayos anteriores para obtener una curva competitiva (Tabla 6). Posteriormente, se adicionó a todos los pozos 50  $\mu\text{L}$  del Ac Myc31 en PBST 0,05% con

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

concentración de 0,012 µg/mL. La solución en la placa se homogenizó suavemente para combinar los reactivos y facilitar la competición. La mezcla fue incubada durante una hora a temperatura ambiente, cubriendo la placa con papel aluminio.

*Tabla 6. Esquema de las concentraciones del anticuerpo monoclonal limitante y el Ag competidor en los pozos del plato de ELISA.*

	PBST	1:1	1:10	1:100	1:1000	Control
Ag38kDa/Myc31	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012
0,000128						
0,00064						
0,0032						
0.016						
0.08						
0.4						
2						
10						

Posterior a la incubación con la mezcla Ag Competidor + Ac monoclonal primario limitante, se realizó un lavado con el fin de retirar las moléculas que no se unieron a las moléculas de Ag38kDa que se encontraban adheridas al fondo del plato de ELISA. Por esto, se posicionó la placa en el lavador automático Wellwash (Thermo Scientific) y se realizaron tres lavados de 500 µL con PBST 0,05%. Al finalizar el lavado se retiró el remanente de solución de lavado, golpeando en seco sobre papel.

### **2.2.5.3 Incubación con el anticuerpo secundario conjugado con HRPO**

Se adicionó 100 µL a cada pozo de la solución del anticuerpo secundario de conejo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano - HRPO (Horseradish peroxidase) fabricado por Abcam (1 µL/10 mL) en PBST 0,05%. La reacción de detección se dejó actuar durante una hora a temperatura ambiente (Gan & Patel, 2013b).

Previo a la reacción de revelado, fueron realizados nuevamente tres lavados de 500 µL con PBST 0,05% recién preparado y a temperatura ambiente, con el fin de retirar el exceso de los reactivos que no formaron inmunocomplejos.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.



### 2.2.5.4 Revelado y parada de la reacción colorimétrica

Se adicionó una solución de 20mg de OPD/ 10mL + 4 $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/10mL en tampón de revelado (Citrato Sódico 25mM, Fosfato Sódico 62mM, pH 5,35 (469mL H<sub>2</sub>O + 31mL PBS 10X + 3,68g (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> \* 2H<sub>2</sub>O))). Para el revelar la formación de inmunocomplejos. Con el propósito de obtener una señal colorimétrica detectable, se adicionó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un aceptor de electrones, que cataliza la oxidación del compuesto OPD. Este compuesto oxidado absorbe a 490 nm lo que ocasiona la coloración de los pozos en los cuales se presentó la ligación del Ac secundario conjugado (Figura 15). El tiempo de reacción para el revelado fue de 10 minutos a temperatura ambiente. A cada pozo se le adicionaron 100  $\mu$ L de solución de parada (Ácido Sulfúrico 2,5M (433,37mL H<sub>2</sub>O + 66,63mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (95%))), para detener el efecto de la solución de revelado y evitar la saturación colorimétrica de los pozos. La lectura de la placa se realizó en el menor tiempo posible posterior a la adición de la solución de parada. Se usó el lector de ELISA (Multiskan FC) en medida diferencial 491-648nm.

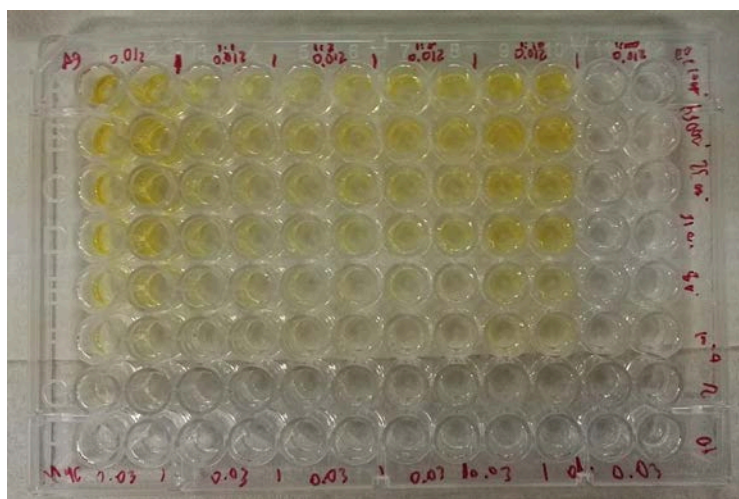


Figura 15. Placa del ensayo matriz luego de ser revelado

La tabla 7 resume el diseño final de la placa ELISA, donde se presentan las diferentes concentraciones de Ag38kDa inmovilizado, Ag Competidor (Ag38kDa) y Anticuerpo Myc31 monoclonal limitante que fueron dispensadas por columnas y filas, respectivamente; de igual, manera se presentan las diluciones de esputo en PBST utilizadas como el solvente de la reacción de competición por columna. Se debe aclarar que las concentraciones de antígeno tapizado se realizaron por duplicado.

Tabla 7. Diseño de la placa de la ELISA Competitiva para evaluar el efecto matriz con las concentraciones de Ag38kDa, Ag competidor y Ac Myc31 monoclonal limitante.

	PBST	1:1	1:10	1:100	1:1000	Control
--	------	-----	------	-------	--------	---------

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Ag38kDa Competidor/Ag38kDa	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012
0,000128						
0,00064						
0,0032						
0,016						
0,08						
0,4						
2						
10 / Myc31	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03

## 2.2.6 MODELO DE AJUSTE DE 4 PARÁMETROS PARA OBTENER LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS ENSAYOS COMPETITIVOS

Una fuente significativa de variación en las curvas de calibración puede deberse a la elección del modelo estadístico usado para crear la curva. Es por esto que es extremadamente importante la selección de un modelo adecuado para el inmunoensayo. Los modelos más utilizados y que se encuentran disponibles en muchos espectrofotómetros son; el modelo lineal, el modelo cuadrático, el modelo logístico de cuatro parámetros y el modelo logístico de cinco parámetros. Para la mayoría de inmunoensayos, los modelos logísticos de cuatro o cinco parámetros son mucho más adecuados que el modelo **linear**, el cuadrático y el log-log **linear** (Cox et al., 2014).

De acuerdo al Plikaytis, Turner, Gheesling, & Carlone (1991) luego de evaluar diferentes modelos, el logístico de cuatro parámetros es el más preciso, presentando poco error y el que más ajusta los valores de absorbancia obtenidos a una curva sigmoideal o en forma de S al graficarlos y por tanto es el que exhibe un mayor beneficio a la hora de ser usado para la obtención de curvas de calibración de ensayos estándar tipo ELISA.

Basado en lo anterior, en el presente trabajo los valores de absorbancia obtenidos a partir de los ensayos fueron ajustados a un modelo logístico de cuatro parámetros, principalmente para la obtención de la curva de calibración competitiva, que puede ser usada con el fin de determinar la cantidad de antígeno 38kDa en una muestra clínica.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

### **3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1 INMUNOENSAYO ELISA BIDIMENSIONAL INDIRECTO**

Como se mencionó en apartados anteriores, se diseñó e implementó un inmunoensayo ELISA bidimensional indirecto para probar diferentes concentraciones del biomarcador de Tb antígeno 38kDa y el anticuerpo primario específico Myc31, con el fin de encontrar una o varias parejas de concentraciones Ac/Ag que ofrecieran señales de absorbancia entre 1 y 2, valores que han sido seleccionados en la literatura como los valores de absorbancia óptimos debido a que se encuentran dentro de la zona de alta estabilidad (Brady, 1995). Estas parejas candidatas fueron usadas posteriormente para realizar un “screening” preliminar de ensayos competitivos, con el fin de encontrar mediante comparación analítica, una curva de calibración competitiva como base estándar para evaluar el efecto matriz de las muestras de esputo.

Los resultados obtenidos de este ensayo bidimensional fueron ajustados a una curva sigmoideal directa (Figura 16). En este tipo de respuesta se puede identificar: una región de mínima reactividad o base, una región lineal o de respuesta directa a la titulación de anticuerpo y un segundo segmento estable o de saturación de la señal conocida como de máxima reactividad. Por debajo de la zona lineal, las concentraciones del analito son tan pequeñas que no llegan a producir un cambio en la señal generada. En contraste, por encima de la zona lineal, a una cierta concentración, la señal del ensayo se satura, dando como resultado una respuesta similar sin importar el cambio en la dosis del analito (Brady, 1995).

En la Figura 16, se presentan los resultados obtenidos del ensayo de titulación descrito en la sección de metodología. Cada una de las gráficas corresponde a una concentración del anticuerpo Ag38kDa y los datos graficados corresponden a la señal obtenida contra la variación en la concentración del anticuerpo Myc31.

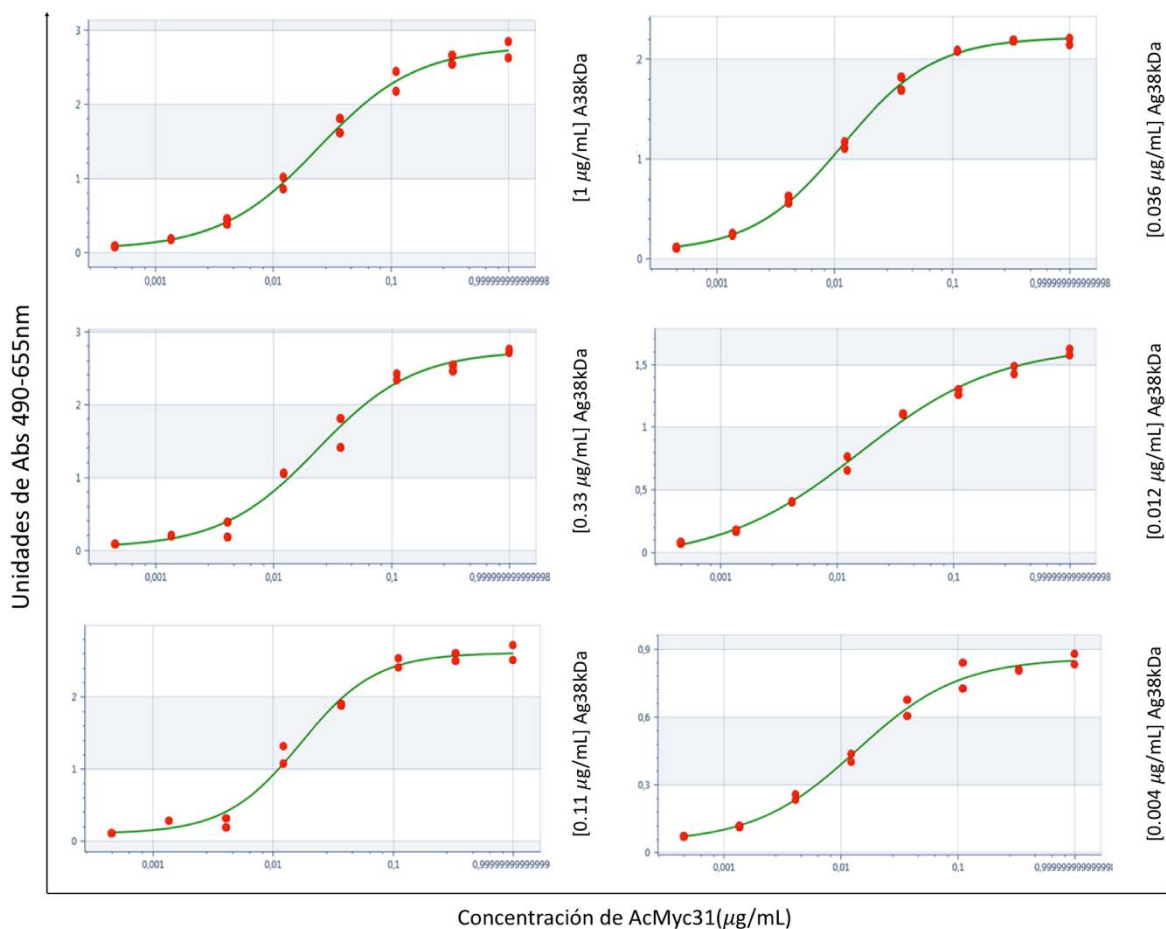


Figura 16. Ensayo Elisa bidimensional indirecta AcMyc31 Vs Ag38kDa de *Mtb*

De acuerdo con el trabajo de (Brady, 1995), las concentraciones que deben ser seleccionadas como base para la reacción de competición de los antígenos por el anticuerpo, con lo cual se obtiene la curva de calibración de un ensayo ELISA competitivo. Se seleccionan las que se encuentran en la región de respuesta de dosis lineal del ensayo bidimensional, preferencialmente entre los valores de absorbancia comprendidos entre 1 y 2.

Teniendo en cuenta lo anterior, a partir de las gráficas fueron seleccionadas las parejas Ac/Ag que cumplieran con ese requisito. Dichas parejas se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Parejas de inmunoreactivos Ac/Ag que presentaron valores de absorbancia entre 1 y 2.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Anticuerpo Myc 31 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Antígeno Ag38kDa ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	0,03
0,33	0,03
0,11	0,03
0,11	0,012
<b>0,03</b>	<b>0,03</b>
<b>0,03</b>	<b>0,012</b>
<b>0,012</b>	<b>0,03</b>
0,012	0,1
0,012	0,3
0,012	1

Para la realización de curvas competitivas fueron seleccionadas las parejas de anticuerpo y antígeno de menor concentración que presentaron una señal entre 1 y 2 (Tabla 8, negrita), esto es: (0,012  $\mu\text{g/mL}$  – 0,03  $\mu\text{g/mL}$ ), (0,03  $\mu\text{g/mL}$  – 0,012  $\mu\text{g/mL}$ ), (0,03  $\mu\text{g/mL}$  – 0,03  $\mu\text{g/mL}$ ), con el fin de optimizar los recursos disponibles para el cumplimiento de los objetivos propuestos en el presente proyecto. De igual manera, se decidió seleccionar las parejas de 0.05  $\mu\text{g/mL}$  – 0.05  $\mu\text{g/mL}$  y 0.05  $\mu\text{g/mL}$  - 0.03  $\mu\text{g/mL}$ , las cuales fueron evaluadas en el trabajo de Jaramillo (2016) y servirán como base para comparar la estabilidad de los ensayos bidimensional y competitivo con este tipo de inmunoreactivos en el tiempo.

### 3.1.1 Validación del modelo para estimar la señal máxima de un ensayo ELISA bidimensional indirecto

Utilizando el modelo logístico de cuatro parámetros, se obtuvieron experimentalmente los valores de la señal obtenida de los pozos de la placa de microtitulación, para cada concentración de anticuerpo iniciando en 0.00045  $\mu\text{g/mL}$  hasta 1  $\mu\text{g/mL}$  a una concentración determinada de antígeno.

El modelo presentado en este trabajo de grado fue utilizado para estimar los parámetros de una ecuación de cuatro parámetros, a partir del modelo matemático propuesto en la ecuación 5.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Luego de obtener los valores para la señal, se realizó una comparación de los valores obtenidos teóricamente, con la implementación del modelo para el cálculo de los parámetros del modelo logístico de cuatro parámetros, con los datos obtenidos experimentales.

Como aclaración, se especifica que los resultados experimentales obtenidos fueron calculados para un haz incidente de energía con longitud de onda de 491nm y no se realizó la resta con los calculados con 648 nm debido a que experimentalmente, los valores de señal entregados para esta longitud de onda, eran inferiores a 0,05 con lo cual los valores de las señales máximas no presentan variación.

A continuación se presentan las gráficas de absorbancia Vs concentración de anticuerpo primario para ambos casos teórico y experimental de un ensayo bidimensional usando las concentraciones de antígeno 0.03  $\mu\text{g/ml}$ , 0.012  $\mu\text{g/ml}$  y 0.003  $\mu\text{g/ml}$ .

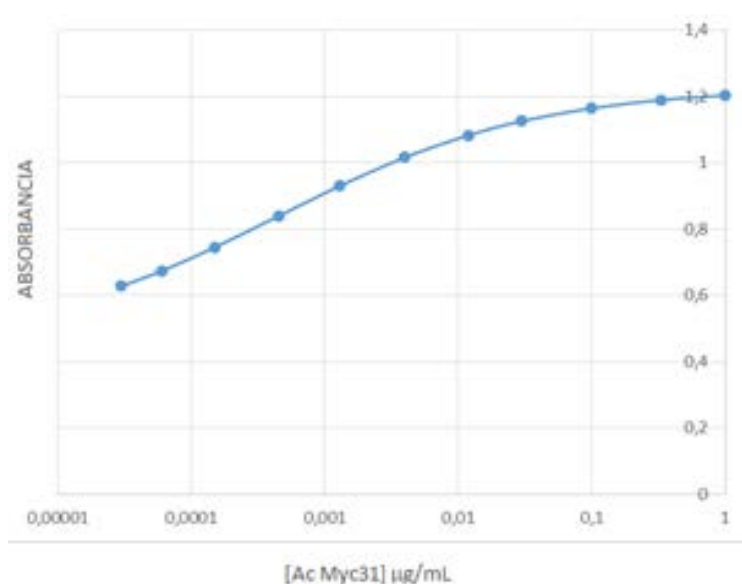


Figura 17. Grafica teórica 0.012 $\mu\text{g/mL}$  Ag38kDa

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

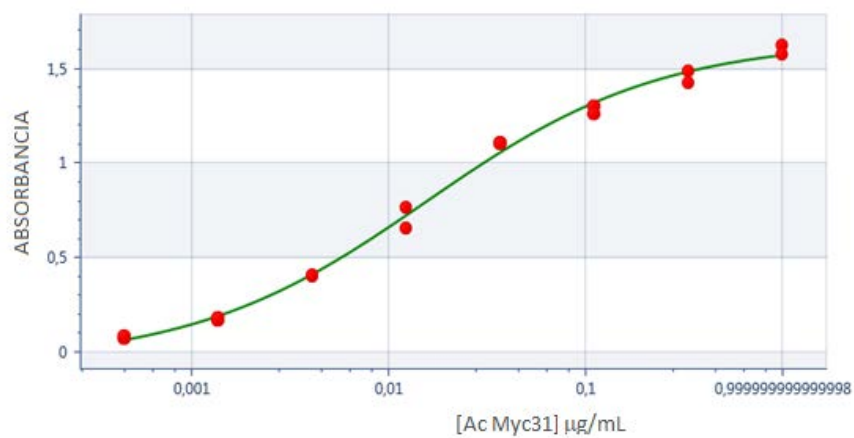


Figura 18. Grafica experimental 0.012 $\mu\text{g/mL}$  Ag38kDa

Tabla 9. Comparación de datos teóricos y experimentales para las curvas de [0.012  $\mu\text{g/mL}$ ]

	Y exp	Y teorico	Error Cuadratico	[Ac Myc31]
1	0,07450	0,83927816	0,585	0,00045
2	0,1690	0,93042718	0,580	0,0013
3	0,4079	1,01642275	0,370	0,003
4	0,7709	1,08354579	0,098	0,012
5	1,114	1,12580804	0,000	0,03
6	1,307	1,16483444	0,020	0,12
7	1,428	1,18947274	0,057	0,3
8	1,629	1,20379302	0,181	1
R^2	0,935			
Error	0,486			

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

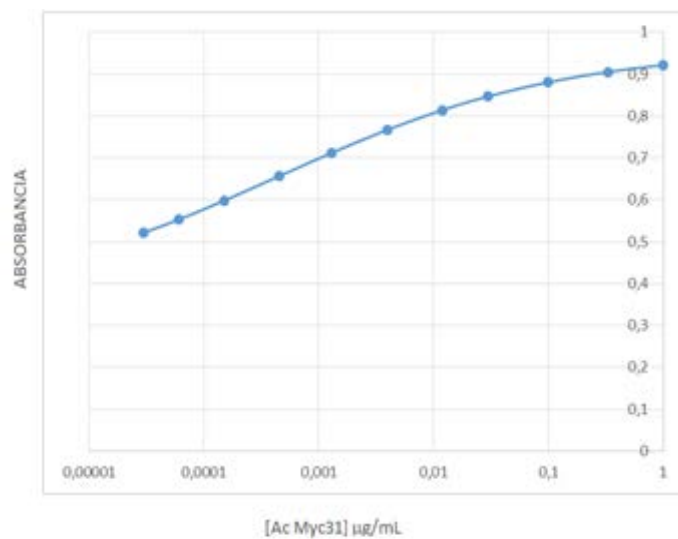


Figura 19. Gráfica teórica 0.003 $\mu\text{g/mL}$  Ag38kDa

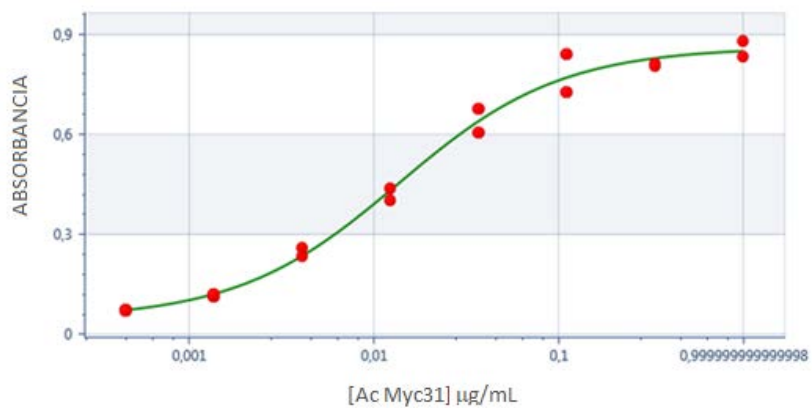


Figura 20. Gráfica experimental 0.003 $\mu\text{g/mL}$  Ag38kDa

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.



Tabla 10. Comparación de datos teóricos y experimentales para [0.003  $\mu\text{g/mL}$ ]

	Y exp	Y teorico	Error Cuadratico	[Ac Myc31]
1	0,0766	0,65605104	0,336	0,00045
2	0,1147	0,71215322	0,357	0,0013
3	0,2365	0,76746641	0,282	0,003
4	0,4048	0,81436561	0,168	0,012
5	0,6054	0,84696789	0,058	0,03
6	0,7289	0,88077763	0,023	0,12
7	0,8145	0,90532395	0,008	0,3
8	0,8821	0,92166287	0,002	1
R^2	0,954			
Error	0,393			

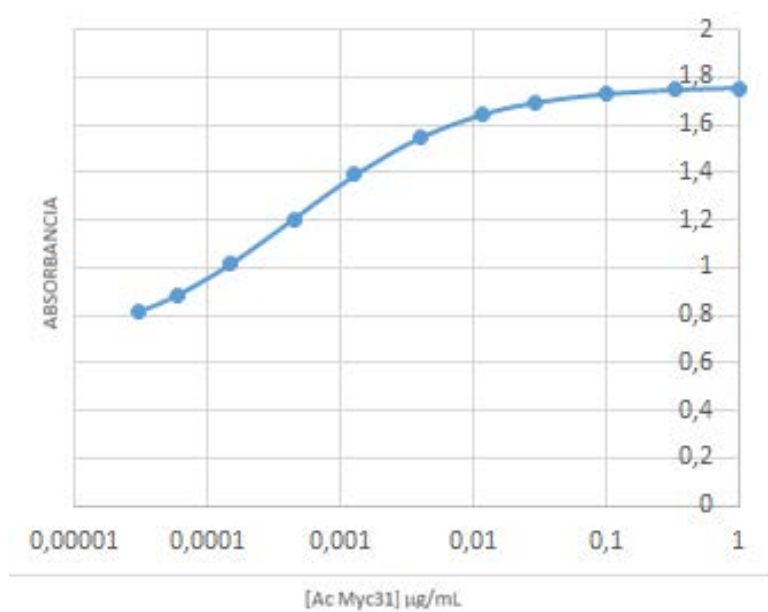


Figura 21. Grafica teórica 0.03 $\mu\text{g/mL}$  Ag38kDa

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

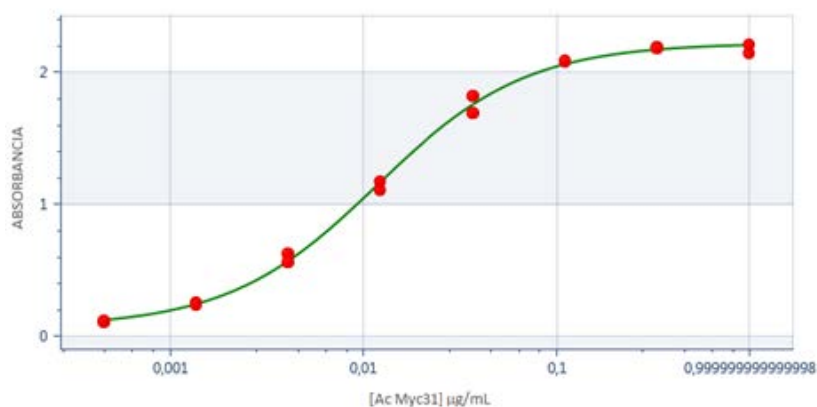


Figura 22. Grafica experimental 0.03 $\mu\text{g/mL}$  Ag38kDa

Tabla 11. Comparación de datos teóricos y experimentales para [0.003  $\mu\text{g/mL}$ ]

	Y exp	Y teorico	Error Cuadratico	[Ac Myc31]
	0,1231	1,2057324	1,17	0,00045
	0,2635	1,39021237	1,27	0,0013
	0,5664	1,54545613	0,96	0,003
	1,181	1,64443428	0,21	0,012
	1,828	1,6941687	0,02	0,03
	1,093	1,73022371	0,41	0,12
	2,184	1,74747563	0,19	0,3
	2,218	1,75521357	0,21	1
R^2	0,752			
Error	0,745			

De acuerdo a los datos estadísticos obtenidos, se obtiene un coeficiente de correlación de Pearson al cuadrado muy cercano a uno para la comparación de las curvas experimentales y teóricas tanto para la concentración 0.012  $\mu\text{g/mL}$  como para la concentración 0.003  $\mu\text{g/mL}$ , esto surge que los datos de teóricos y experimentales tienen una relación lineal alta ("Coeficiente de correlación lineal de pearson," n.d.). De igual manera, es posible observar que el error cuadrático disminuye a medida que aumenta la señal (Y) y los valores experimentales y teóricos son cercanos para los valores de señal máxima, sugiriendo que este modelo podría ser utilizado para estimar la señal máxima teórica de un ensayo ELISA bidimensional.

Un ensayo ELISA bidimensional es crítico durante la estandarización de un ensayo ELISA competitivo por dos razones fundamentales: i) si el anticuerpo primario no se ajusta adecuadamente a una concentración limitante se corre el riesgo de saturar el ensayo y detectar falsos positivos, ii) por el contrario, si el antígeno tapizado en los pozos y el

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

anticuerpo primario se ofrecen a una concentración muy baja para la competición, la señal obtenida puede ser tan baja que el rango de detección del ensayo se vea comprometido durante la cuantificación del analito. Por lo anterior, es indispensable encontrar un balance entre las concentraciones de los reactivos usados para la detección de un analito en el formato competitivo. Para ello, lo más recomendable es el diseño e implementación de un ensayo de titulación, en este caso un Elisa bidimensional, el cual consiste en probar diferentes concentraciones del anticuerpo y el antígeno simultáneamente, para posteriormente seleccionar las duplas de reactivos que generan una señal entre 1 y 2 unidades de absorbancia en la región lineal de la respuesta sigmoidal directa obtenida (Boster, 2017) (Thermo Fisher Scientific, n.d.-a) (Brady, 1995).

Es por lo anterior, que el modelo desarrollado como objetivo adicional del presente trabajo, podría resultar como una alternativa útil para realizar una primera estimación de las duplas de reactivos que producen una señal entre 1 y 2 unidades de absorbancia en la región lineal de la respuesta sigmoidal directa de un inmunoensayo ELISA bidimensional indirecto. Los resultados obtenidos con el presente modelo indican que las señales teóricas máximas que se obtiene presentan valores cercanos a la señal experimental que se espera, teniendo un bajo error cuadrático. La implementación de este modelo como primera aproximación a la selección de un conjunto de duplas de reactivos que se estimen tendrá señales máximas entre 1 y 2 unidades de absorbancia en su región lineal de la curva sigmoidal, lo cual podría representar una disminución considerable en el gasto de reactivos y en el tiempo de realización de los ensayos.

Es importante resaltar que el modelo no presenta una estimación adecuada de la señal en las concentraciones más bajas de anticuerpo (fondos), lo cual será abordado como trabajo futuro dentro de la línea de investigación con el objetivo de evaluar la razón por la cual no se presenta una estimación adecuada de fondos y como sería posible alterar el modelo para tener unos mejores resultados en este caso.

### **3.2 INMUNOENSAYO ELISA COMPETITIVO INDIRECTO**

En la fase de desarrollo de un inmunoensayo competitivo, se debe realizar un ajuste en las cantidades usadas de antígeno y anticuerpo con el fin de optimizar el ensayo al punto de tener la mejor sensibilidad para la detección del analito en cuestión, con la menor cantidad de inmunoreactivos posible. Dicha sensibilidad se puede estimar determinando alguno de los siguientes parámetros: la cantidad más baja de la molécula de interés que el inmunoensayo puede detectar (límite de detección), la precisión del blanco o al estimar aquellas concentraciones de analito que producen una cierta reducción de la señal máxima.

Esta última es la más utilizada, donde se espera encontrar un valor de inhibición del 50% de la señal, debido a que la sensibilidad del ensayo debería ser mayor en la parte central de la curva estándar. De igual manera se suele utilizar el parámetro  $I_{50}$  de un ensayo, el cual hace referencia a la concentración que reduce la señal máxima de toda la curva en un 50%, como una estimación indirecta de la afinidad del anticuerpo por el analito. Otros

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

parámetros analíticos de interés en una curva competitiva son: la concentración de analito que reduce la señal máxima un 10%, que es llamada límite de detección (OLD) y el rango de cuantificación o trabajo a la concentración más baja de la molécula de interés, el cual es denominado límite de cuantificación (LOQ), que comprende concentraciones de analito entre el 20% y 80% de reducción de la señal (Brady, 1995).

Teniendo en cuenta lo anterior, las curvas competitivas, usando las parejas de reactivos seleccionadas en el ensayo bidimensional, fueron analizadas según sus características analíticas conforme al modelo de 4 parámetros discutido en la sección de metodología y cuya ecuación se presenta nuevamente a continuación:

$$y = \frac{(A - D)}{\left[1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B\right] + D}$$

La Figura 23 presenta las curvas logísticas competitivas obtenidas al usar las parejas de reactivos (0,05 µg/mL – 0,05 µg/mL), (0,05 µg/mL – 0,03 µg/mL), (0,012 µg/mL – 0,03 µg/mL), (0,03 µg/mL – 0,012 µg/mL), (0,03 µg/mL – 0,03 µg/mL) como base de la reacción de competición. Cada gráfica representa una pareja de anticuerpo – antígeno vs diferentes concentraciones del antígeno competidor en este caso el propio antígeno 38kDa estándar.

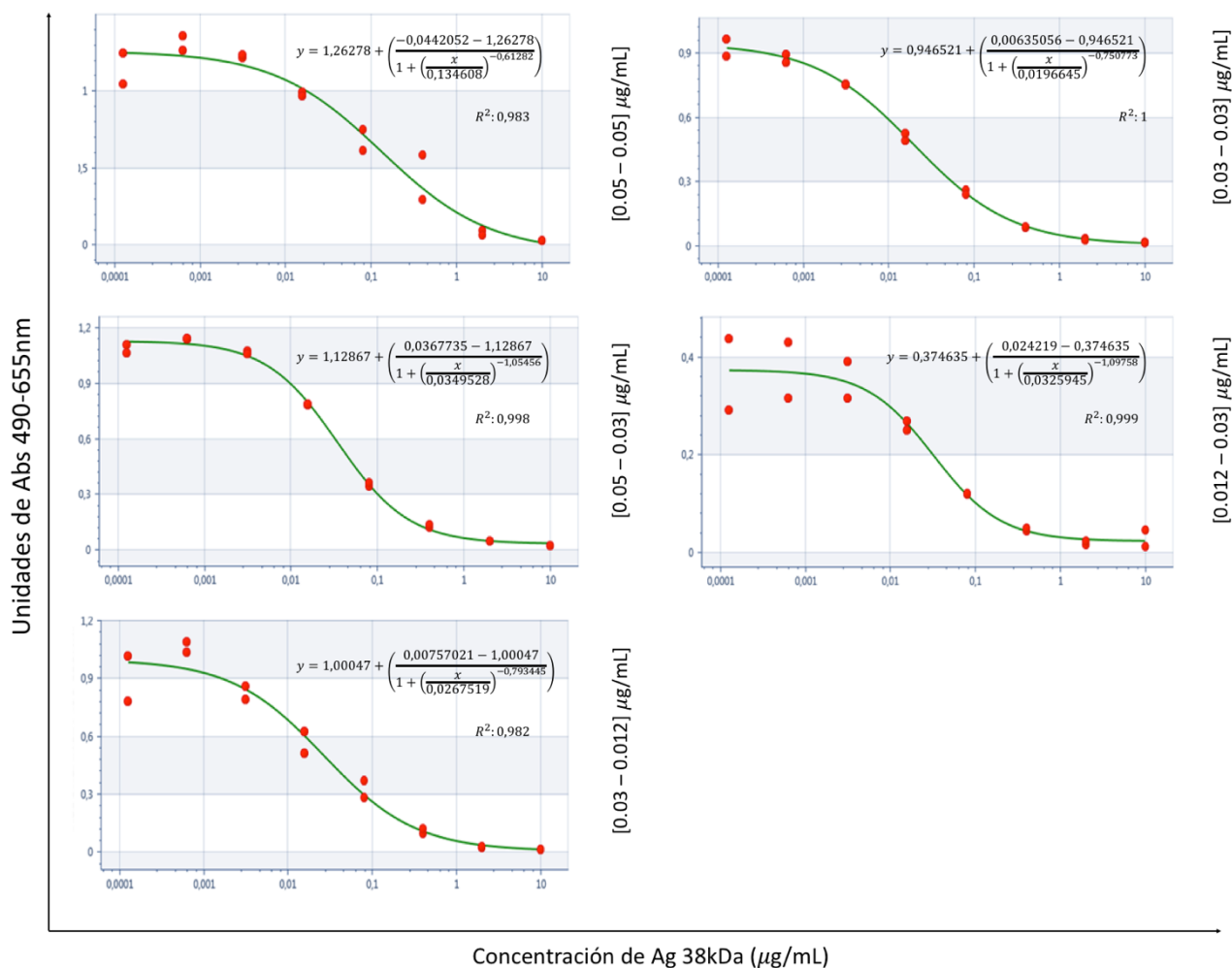


Figura 23. Ensayo ELISA competitivo indirecto preliminar.

Las curvas competitivas anteriormente obtenidas fueron analizadas con el fin de encontrar la curva de calibración más adecuada para realizar ensayos de repetibilidad. La mejor curva es escogida de acuerdo a la sensibilidad, la concentración de analito en el punto máximo de inflexión o  $I_{50}$  y el  $R^2$ . La tabla 12 presenta la comparación analítica de los parámetros ajustados de cada curva, a partir de la cual se elige la o las mejores curvas competitivas para realizar los ensayos de repetibilidad.

Tabla 12. Parámetros analíticos de las curvas competitivas preliminares ajustadas al modelo logístico de 4 parámetros

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Concentración Ac/Ag	A	B	C ( $I_{50}$ )	D	R <sup>2</sup>	Amplitud de la señal (A-D)	Sensibilidad (A-D)/C
0,05 – 0,05	0,0442052	0,691282	0,134608	1,26278	0,983	1,2185748	9,052766552
<b>0,05 – 0,03</b>	0,0367735	1,05456	0,0349528	1,12867	0,998	1,0918965	31,23917111
<b>0,03 – 0,012</b>	0,0757021	0,793445	0,0267519	1,00047	0,982	0,99289979	34,5683073
<b>0,03 – 0,03</b>	0,00635056	0,750773	0,0196645	0,946521	1	0,94017044	47,81054387
0,012 – 0,03	0,0242129	1,09758	0,0325945	0,374635	0,999	0,3504221	10,75095798

De las curvas obtenidas, las parejas anticuerpo/antígeno que proporcionaron una mayor sensibilidad (A-D)/C son (0,03  $\mu\text{g/mL}$  – 0,012  $\mu\text{g/mL}$ ), (0,05  $\mu\text{g/mL}$  – 0,03  $\mu\text{g/mL}$ ), (0,03  $\mu\text{g/mL}$  – 0,03  $\mu\text{g/mL}$ ). Con estas parejas se realizará el ensayo nuevamente para observar si las curvas competitivas obtenidas son constantes en el tiempo, con el fin de establecer cuál es la curva de calibración más adecuada para ser escogida como curva de calibración estándar para evaluar el efecto matriz de las muestras de esputo.

### 3.2.1 ENSAYOS DE REPETIBILIDAD DE LAS CURVAS COMPETITIVAS PRESELECCIONADAS

A continuación, se muestra los resultados del ensayo de repetibilidad para las parejas de curvas seleccionadas en el apartado anterior.

La figura 24 presentan las curvas competitivas obtenidas para la pareja de Anticuerpo/Antígeno con concentración (0,05  $\mu\text{g/mL}$ , 0,03  $\mu\text{g/mL}$ ) y adicionalmente se presenta una tabla con la información de los parámetros analíticos que se obtienen del ajuste de los valores de absorbancia al modelo de 4 parámetros. El ensayo fue realizado por duplicado y se obtuvieron tres curvas en ensayos independientes.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

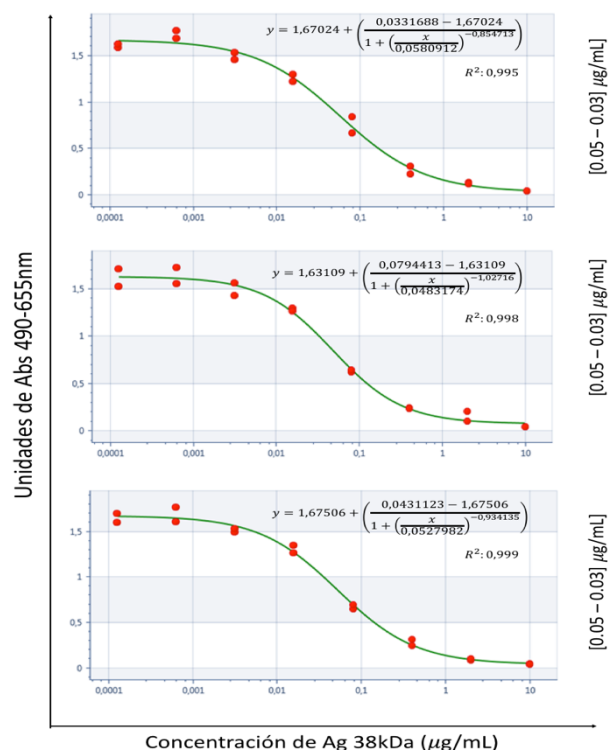


Figura 24. Ensayo de repetibilidad competitivo para la pareja (0,05 µg/ml, 0,03 µg/ml)

Tabla 13. Parámetros analíticos de las curvas competitivas de repetibilidad para la pareja (0,05 µg/ml, 0,03 µg/ml) ajustadas al modelo logístico de 4 parámetros.

Concentración Ac/Ag	A	B	C (I50)	D	R <sup>2</sup>	Amplitud de la señal (A-D)	Sensibilidad (A-D)/C
0,05 – 0,03	0,0331688	0,854713	0,0580912	1,67024	0,995	1,6370712	28,1810532
0,05 – 0,03	0,0794413	1,02716	0,0483174	1,63109	0,998	1,5516487	32,113663
0,05 – 0,03	0,0431123	0,934135	0,0527982	1,67506	0,998	1,6319477	30,9091541

La figura 25 presenta las curvas obtenidas para la pareja de Anticuerpo/Antígeno con concentración (0,03 µg/ml, 0,03 µg/ml). Adicionalmente se presenta una tabla con la información de los parámetros analíticos que se obtienen del ajuste de los valores de absorbancia al modelo de 4 parámetros. El ensayo fue realizado por duplicado y se obtuvieron tres curvas en ensayos independientes.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

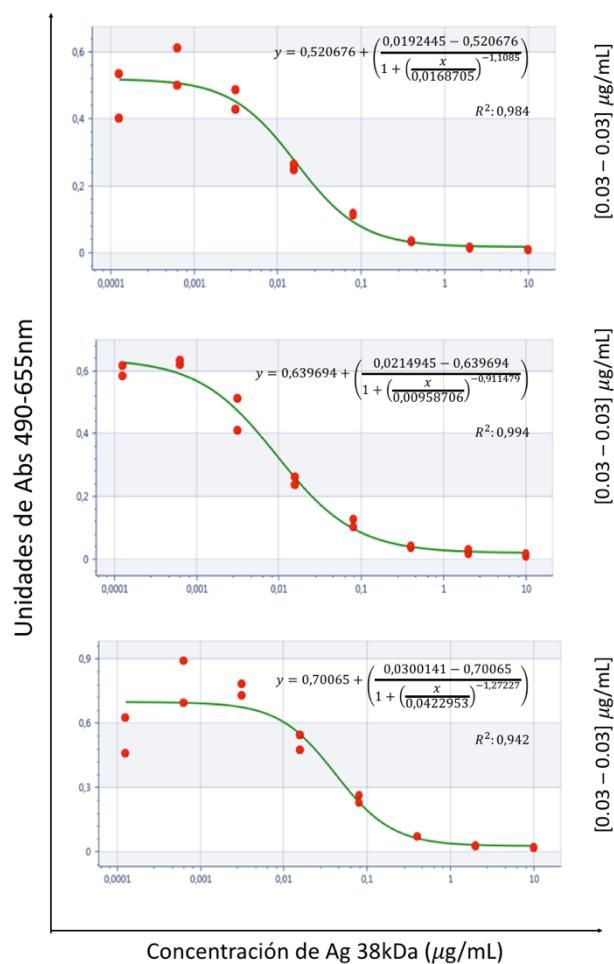


Figura 25. Ensayo de repetibilidad competitivo para la pareja (0,03 µg/ml, 0,03 µg/ml)

Tabla 14. Parámetros analíticos de las curvas competitivas de repetibilidad para la pareja (0,03 µg/ml, 0,03 µg/ml) ajustadas al modelo logístico de 4 parámetros.

Concentración Ac/Ag	A	B	C (I <sub>50</sub> )	D	R <sup>2</sup>	Amplitud de la señal (A-D)	Sensibilidad (A-D)/C
0,03 – 0,03	0,0192445	1,1085	0,0168705	0,520676	0,984	0,5014315	29,7223852
0,03 – 0,03	0,0214945	0,911479	0,00958706	0,639694	0,994	0,6181995	64,4826986
0,03 – 0,03	0,0300141	1,27227	0,0422953	0,70065	0,942	0,6706359	15,85603838

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.



La figura 26, presenta las curvas obtenidas para la pareja de Anticuerpo/Antígeno con concentración (0,03 µg/ml, 0,012 µg/ml) y adicionalmente se presenta una tabla con la información de los parámetros analíticos que se obtienen del ajuste de los valores de absorbancia al modelo de 4 parámetros. El ensayo fue realizado por duplicado y se obtuvieron tres curvas en ensayos independientes.

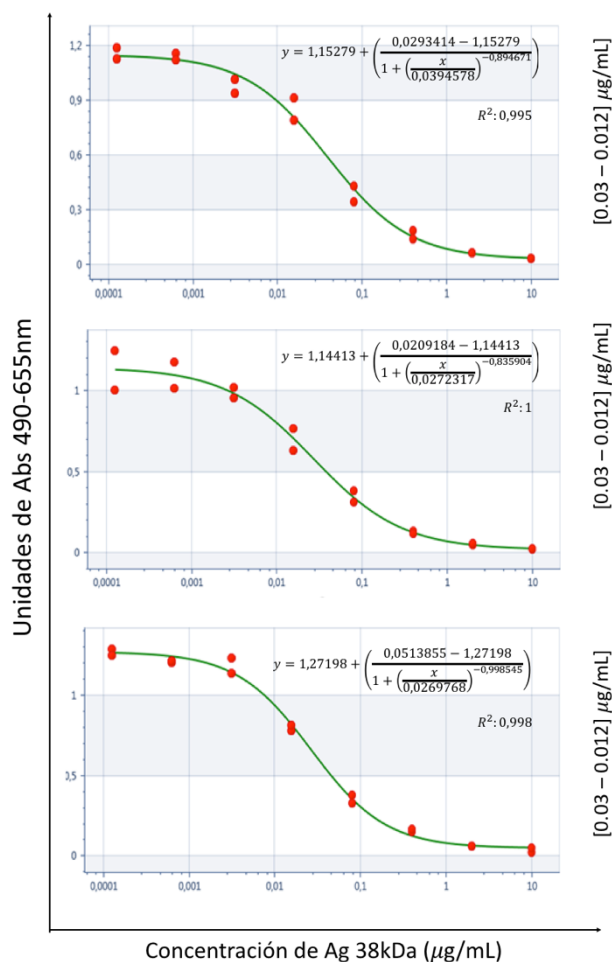


Figura 26. Ensayo de repetibilidad competitivo para la pareja (0,03 µg/ml, 0,012 µg/ml)

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Tabla 15. Parámetros analíticos de las curvas competitivas de repetibilidad para la pareja (0,03 µg/ml, 0,012 µg/ml) ajustadas al modelo logístico de 4 parámetros.

Concentración Ac/Ag	A	B	C (I <sub>50</sub> )	D	R <sup>2</sup>	Amplitud de la señal (A-D)	Sensibilidad (A-D)/C
0,03 – 0,012	0,0293414	0,894671	0,0394578	1,15279	0,995	1,1234486	28,4721551
0,03 – 0,012	0,0209184	0,835904	0,0272317	1,14413	1	1,1232116	41,2464738
0,03 – 0,012	0,0513855	0,998545	0,0269768	1,2198	0,998	1,2205945	43,3118272

Con la finalidad de seleccionar la pareja con la mejor sensibilidad y mayor estabilidad analítica, se realizó el promedio de cada uno de los parámetros obtenidos de las triplicadas de las curvas competitivas de cada pareja. Los resultados se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Parámetros analíticos promedio de las curvas competitivas de repetibilidad para cada pareja anticuerpo – antígeno que fueron ajustadas al modelo logístico de 4 parámetros.

Concentración Ac/Ag	A	B	C (I <sub>50</sub> )	D	R <sup>2</sup>	Amplitud de la señal (A-D)	Sensibilidad (A-D)/C
0,05 – 0,03	0,042123 975	0,967642	0,048539 9	1,526265	0,9972 5	1,484141025	30,45208
<b>0,03 – 0,012</b>	0,044336 85	0,880641 25	0,030104 55	1,129297 5	0,9937 5	1,08496065	36,03975645
0,03 – 0,03	0,019275 915	1,0108	0,022104 34	0,701884 25	0,98	0,682608335	30,88119053

Luego de los ensayos de repetibilidad se puede observar que: las triplicadas de la pareja (0,05-0,03) fueron muy estables y el valor promedio de sensibilidad (A-D)/C fue muy parecida con la obtenida en el ensayo preliminar de la tabla 12. Contrario a lo observado para esta pareja, los ensayos de repetibilidad de la pareja (0,03-0,03) fue realmente variable y la sensibilidad promedio del ensayo de repetibilidad fue cualitativamente diferente al reportado en el ensayo preliminar de la tabla 12. Por último, el ensayo de repetibilidad realizado para la pareja (0,03-0,012) fue bueno al considerar que dos de las tres triplicadas fueron muy parecidas y la sensibilidad fue realmente cercana al ensayo preliminar de la tabla 12. Teniendo en cuenta lo anterior y la comparación de los parámetros analíticos promedio del ensayo de repetibilidad, se puede decir que la mejor curva de calibración que representa un ensayo ELISA estándar competitivo, es la curva realizada a partir de la pareja de inmunoreactivos Ac/Ag (0,03-0,012), porque es la curva que presentó la sensibilidad

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

más alta (36,04) y el I50 más bajo (0,88) (Tabla 16, negrita), además de comportarse de manera cualitativamente estable en el tiempo.

### **3.3 EFECTO MATRIZ**

El objetivo de un inmunoensayo ELISA competitivo estándar, como se plantea en este proyecto, es la detección del antígeno 38kDa (biomarcador de Tb), contenido en muestras de pacientes, como método alternativo *per se* para el diagnóstico de Tb activa; además de servir como prueba de referencia para la validación de otros métodos alternativos de detección como los biosensores. Este antígeno puede estar presente en diversas muestras clínicas de pacientes con Tb activa, entre ellas muestras de esputo que se conocen por ser muestras con una composición o matriz compleja.

Para este trabajo fueron donadas muestras de esputo recolectadas de diferentes pacientes y diagnosticadas como Tb (-) mediante baciloscopia y cultivo. Los estudios diagnósticos para confirmar estas muestras fueron realizados por la unidad de bacteriología y mico bacterias de la Corporación para investigaciones biológicas de Antioquia- CIB.

Como se comentó en el marco teórico, la composición del esputo es bastante compleja, por la presencia de grandes polímeros y otras moléculas que se encuentran presentes en estas muestras. Estas características le confieren, entre otras, propiedades viscoelásticas especiales (Voynow & Mengr, 2009), las cuales pueden afectar el desempeño analítico de un ensayo ELISA competitivo estándar. Por lo tanto, es necesario realizar un ensayo matriz, en el cual se evalúen diferentes proporciones de muestras de esputo Tb (-) en el solvente PBST, para determinar, como dicha matriz, pueden afectar o no los parámetros analíticos de la curva logística estándar de cuatro parámetros obtenida en el presente trabajo (Figura 20) (Voynow & Mengr, 2009). La figura 27, muestra los resultados obtenidos luego de realizar el ensayo de efecto matriz, usando como solvente del antígeno competidor (Ag38kDa) las siguientes soluciones: PBST, Esputo 1:1, Esputo 1:10, Esputo 1:100, Esputo 1:1000 en PBST.

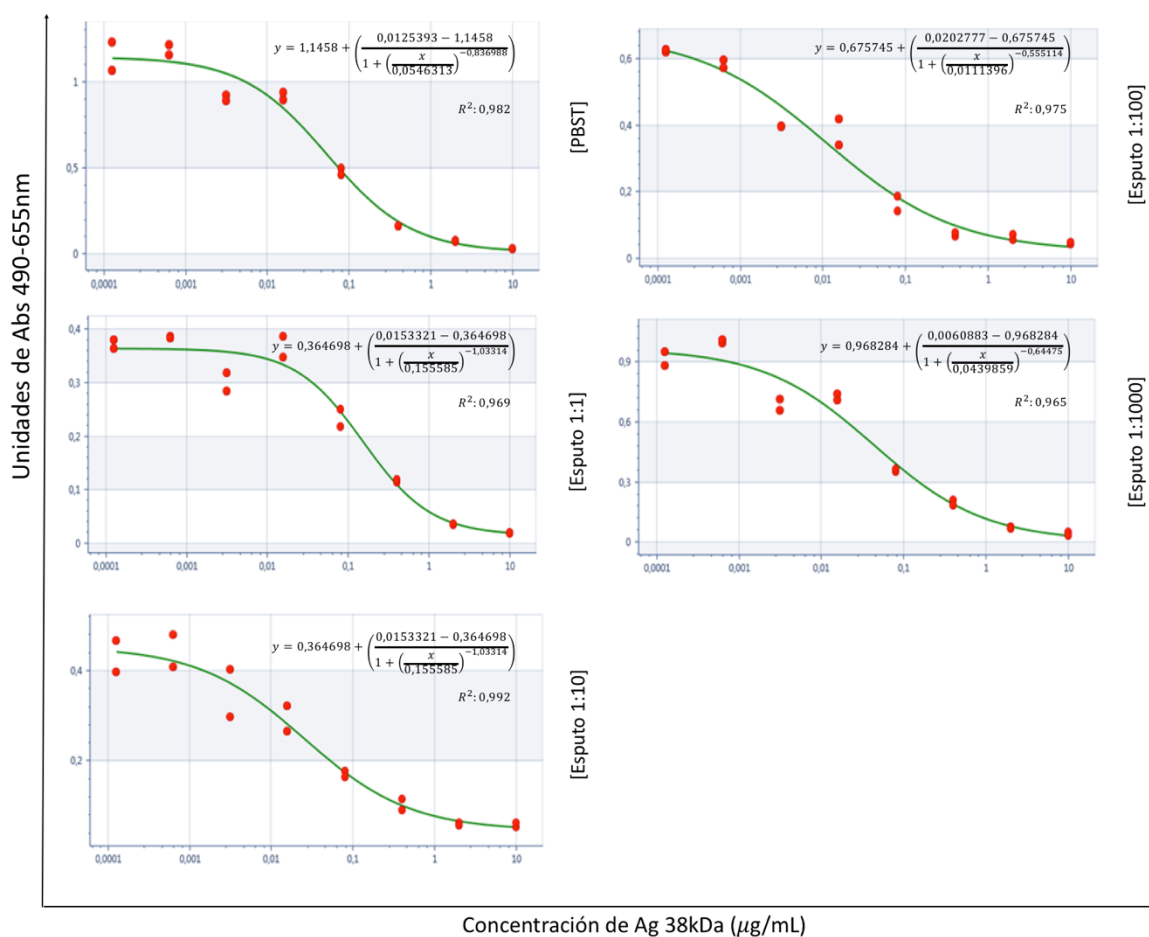


Figura 27. Evaluación del efecto matriz en la curva de calibración de un inmunoensayo ELISA estándar usando, 0,03  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpo Myc31 limitante y 0,012  $\mu\text{g/ml}$  de antígeno Ag38kDa para el tapizado de la placa. Se usó como antígeno competidor el propio Ag38kDa estándar a diferentes concentraciones diluido en diferentes soluciones de muestras de esputo.

Con el objetivo de comparar visualmente las gráficas obtenidas, éstas se presentan en una sola figura, acompañada de la tabla que resume los parámetros analíticos de las curvas logísticas ajustadas (Tabla 17). Esta tabla proporciona dos datos importantes para establecer qué tanto se ve afectada la curva competitiva por la matriz de la muestra, que son: la sensibilidad de la curva (última columna) y el valor de  $I_{50}$  o parámetro C.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

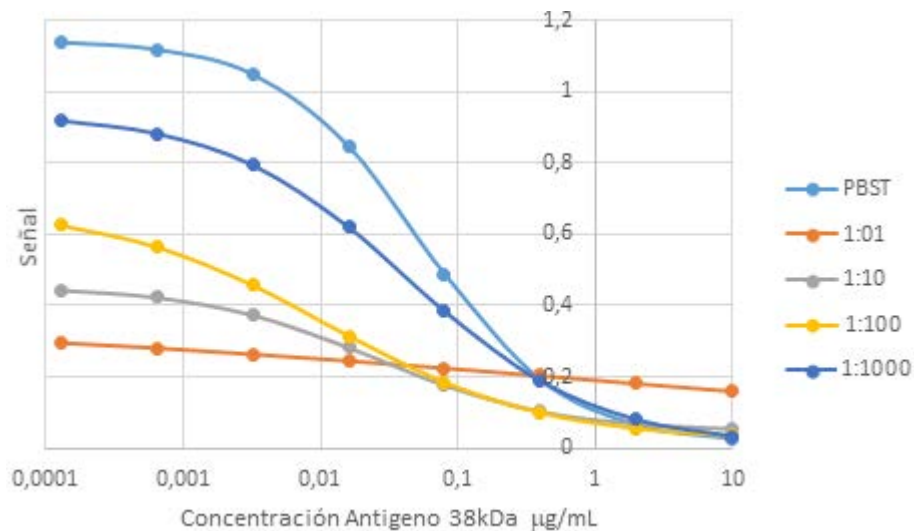


Figura 28. Curvas de concentración 0,03 µg/ml de anticuerpo Myc31 limitante y 0,012 µg/ml de antígeno Ag38kDa con diferentes proporciones de solvente PBST: Esputo

Al comparar estos parámetros entre la curva de calibración estándar, obtenida cuando el solvente es PBST (Tabla 17, primera fila), frente a los parámetros de las curvas competitivas cuando el solvente fueron las diferentes diluciones de las muestras de esputo en PBST, se podría decir que, excepto la dilución 1:1, es decir con solvente 100% y la dilución 1:10, las diluciones de 1:100 y 1:1000 mejoran la sensibilidad absoluta (A-D)/C y el parámetro I50 (C) del ensayo competitivo.

Tabla 17. Parámetros analíticos de las curvas competitivas del ensayo de efecto matriz ajustadas al modelo logístico de 4 parámetros.

PBST: Esputo	A	B	C (I50)	D	R <sup>2</sup>	Amplitud de la señal (A- D)	Sensibilida d (A-D)/C
PBST	0,0125393	0,836988	0,0546313	1,1458	0,982	1,1332607	20,7437989
1:1	0,0153321	1,03314	0,155585	0,364698	0,969	0,3493659	2,2454986
1:10	0,0464383	0,669598	0,0256164	0,453944	0,992	0,4075057	15,91016
1:100	0,0202777	0,555114	0,0111396	0,675745	0,975	0,6554673	58,8411882
1:1000	0,0060883	0,64475	0,0439859	0,968284	0,965	0,9621957	21,8750941

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Sin embargo, para tener una visión real de los efectos de la matriz de la muestra sobre el inmunoensayo competitivo, es necesario determinar otros parámetros analíticos importantes del desempeño de un ensayo competitivo de este tipo con fines clínicos que son: el límite de detección (LOD), el cual es definido como la concentración de analito que inhibe un 10% de la señal máxima, o que proporciona una señal igual al 90%, el  $I_{50}$  o valor que inhibe el 50% de la señal máxima y el rango dinámico de trabajo del ensayo, el cual se refiere a las concentraciones que inhiben entre el 20% y el 80% de esta señal (Brady, 1995). Estos parámetros se presentan en la tabla 18.

*Tabla 18. Características analíticas de las curvas competitivas del ensayo de efecto matriz, ajustadas al modelo logístico de 4 parámetros.*

Concentración de analito Ag38kDa ( $\mu\text{g/mL}$ )	Parámetros ensayo 1 (PBST)	Parámetros ensayo 2 (1:1)	Parámetros ensayo 3 (1:10)	Parámetros ensayo 4 (1:100)	Parámetros ensayo 5 (1:1000)
$I_{50}$	0,055	0,156	0,026	0,011	0,048
Límite de detección (LOD)	0,004	0,019	0,001	0,00021	0,002
Rango de trabajo	0,010-0,286	0,041-0,595	0,003-0,203	0,001-0,135	0,005-0,484

Analizando los parámetros de la tabla 18, se observa que, al usar una muestra de esputo pura (ensayo 2) el desempeño analítico del ensayo competitivo se ve afectado negativamente en cuanto a  $I_{50}$ , se requiere mayor cantidad de analito para el punto de inflexión de la curva, o lo que es lo mismo la curva pierde sensibilidad de detección y se observa igualmente una disminución en la capacidad del límite de cuantificación. Por otra parte, si al observar las características del ensayo, en el que se usa la cantidad de esputo más diluida como solvente, se ve que los parámetros analíticos de sensibilidad, límite de detección y rango de trabajo son muy favorables, sino mejores, que los de la curva estándar (PBST). Sin embargo, usar una cantidad de muestra de esputo tan diluida para fines clínicos no sería del todo viable, al pensar que con este factor de dilución también se estaría diluyendo el analito de interés, lo que probablemente lo deje por fuera del rango de detección del ensayo. En este caso se podría decir que, en términos de sensibilidad ( $I_{50}$ ), límite de detección y rango de trabajo, las diluciones de las muestras de esputo más favorables para ser usadas en aplicaciones clínicas serían las diluciones 1:10 o 1:100, con la cual el efecto matriz sobre el inmunoensayo competitivo es nulo y el analito en la muestra probablemente no está tan diluido como para evitar su detección por la curva de calibración del ensayo. Por lo anterior, diluciones de las muestras de esputo por encima de 1:10 no deberán ser usadas con propósitos clínicos en un ensayo ELISA competitivo para la detección de antígenos en muestras de esputo, debido a que el analito se encuentra muy diluido y es posible que no se de una adecuada detección del mismo al realizar el ensayo.

Una posible explicación del porqué diluciones mayores a 1:10 o incluso la dilución 1:1 afecta tanto el ensayo competitivo, puede ser debido a que el esputo se comporta como un fluido

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

no newtoniano, con una viscosidad entre  $\sim 0.19$  y  $2.07 P$  (Ochoa, Ruiz, & Sueiro, 1983), por lo que es probable que las moléculas necesiten una mayor energía para desplazarse en el esputo por ser un fluido más viscoso. Debido a que las moléculas deben estar muy cerca unas de otras para que interactúen las fuerzas de van der Waals y se de una formación del inmunocomplejo (Bell, 1978), es probable que algunos anticuerpos no logren llegar al fondo de los pozos o cerca al antígeno tapizado por falta de energía, lo que se traduce en una reducción significativa de la señal y en un efecto matriz negativo para el ensayo.

## 4 CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluó el efecto matriz de muestras de esputo sobre una curva de calibración de un inmunoensayo ELISA competitivo estándar. Este estudio no ha sido reportado en ningún tipo de trabajo científico hasta el momento, como tampoco se encontró ningún método de diagnóstico o kit comercial en el que se use una ELISA competitiva para la detección del Ag38kDa de *Mtb* en muestras de esputo.

Con base en la comparación analítica de los parámetros de tres curvas competitivas preliminares (ajustadas a una curva logística de 4 parámetros), se encontró que la mejor pareja de inmunoreactivos, para implementar una curva de calibración de un ensayo ELISA competitivo estándar, fue 0,03 µg/mL del anticuerpo Myc 31 y 0,012 µg/mL del antígeno 38kDa para el tapizado de la placa, para la detección de Ag38kDa en muestras de esputo.

Usando diferentes diluciones de muestras de esputo como solventes de las curvas competitivas, se evaluó el efecto de la matriz de la que se componen estas muestras sobre los parámetros analíticos de una curva de calibración competitiva previamente encontrada. De este ensayo de efecto matriz se obtuvo que, el cambio parcial o total del solvente estándar por esputo genera una reducción de la señal, proporcional a la cantidad de esputo que se utilice como solvente; sin embargo, no se observó ningún efecto negativo sobre las características analíticas más importantes del ensayo ELISA competitivo para la detección de Ag38kDa con anticuerpo Myc31, al usar diluciones de muestras de esputo por debajo de 1:10.

Los resultados reportados en este trabajo sirven como base para establecer estudios comparativos en etapas de validación clínica de dispositivos que operan bajo el mismo principio de inmunodetección como los biosensores, con el propósito de ser usados como métodos alternativos en el diagnóstico de la Tb.

Finalmente, el modelo desarrollado como objetivo adicional del presente trabajo, podría resultar como una alternativa útil para realizar una primera estimación de las duplas de reactivos que producen una señal entre 1 y 2 unidades de absorbancia en la región lineal de la respuesta sigmoidal directa de un inmunoensayo ELISA bidimensional indirecto. La implementación de este modelo como primera aproximación a la selección de un conjunto de duplas de reactivos que se estimen tendrá señales máximas entre 1 y 2 unidades de absorbancia en su región lineal de la curva sigmoidal, lo cual podría representar una disminución considerable en el gasto de reactivos y en el tiempo de realización de los ensayos.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.



## 5 REFERENCIAS

- Abebe, F., Holm-Hansen, C., Wiker, H. G., & Bjune, G. (2007). Progress in serodiagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection. *Scandinavian Journal of Immunology*, 66(2–3), 176–191. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.01978.x>
- Arias-bouda, L. M. P., Nguyen, L. A. N. N., Ho, L. Y. M., Kuijper, S., Jansen, H. M., & Kolk, A. H. J. (2000). Development of Antigen Detection Assay for Diagnosis of Tuberculosis Using Sputum Samples, 38(6), 2278–2283.
- Arnau, A. (2008). Piezoelectric Transducers and Applications, 2 ed. *Vale*(April), 532. <http://doi.org/10.1007/978-3-540-77507-9>
- Bekmurzayeva, A., Syapabekova, M., & Kanayeva, D. (2013). Tuberculosis diagnosis using immunodominant, secreted antigens of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*, 93(4), 381–388. <http://doi.org/10.1016/j.tube.2013.03.003>
- Bell, G. I. (1978). Models for the Specific Adhesion of Cells to Cells.
- Boster. (2017). How to Use Checkerboard Titration to Optimize your ELISA Immunoassays. Retrieved from <https://www.bosterbio.com/newsletter-archive/20170616-checkerboard-titration>
- Brady, J. F. (1995). Interpretation of Immunoassay Data. *ACS Symposium Series*, 586, 266–287. <http://doi.org/10.1021/bk-1995-0586.ch019>
- Caminero, J. A., Casal, M., Ausina, V., Pina, J. M., & Sauret, J. (2000). Diagnóstico de la tuberculosis. *Arch Bronconeumol*, 32, 85–89.
- Chan, E. D., Heifets, L., & Iseman, M. D. (2000). Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review. *Tubercle and Lung Disease*, 80(3), 131–40. <http://doi.org/10.1054/tuld.2000.0243>
- Coeficiente de correlación lineal de pearson. (n.d.), 1–20.
- Cox, K. L., Devanarayan, V., Kriauciunas, A., Montrose, C., & Sittampalam, S. (2014). Immunoassay Methods, 1–44.
- Cultek. (2006a). Fundamentos y Tipos de ELISAs., 1. Retrieved from <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-protocolos.pdf>
- Cultek. (2006b). Fundamentos y Tipos de ELISAs., 1.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

- G-Bioscience. (n.d.). PBST (Phosphate Buffered Saline with Tween 20). Retrieved from <https://www.gbiosciences.com/Buffers-Reagents-Chemicals/PBST-10X>
- Gan, S. D., & Patel, K. R. (2013a). Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), e12. <http://doi.org/10.1038/jid.2013.287>
- Gan, S. D., & Patel, K. R. (2013b). Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), e12. <http://doi.org/10.1038/jid.2013.287>
- Glickman, M. S., & Jacobs, W. R. (2001). Microbial pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: Dawn of a discipline. *Cell*, 104(4), 477–485. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00236-7](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00236-7)
- Hajšlová, J., Holadová, K., Kocourek, V., Poustka, J., Godula, M., Cuhra, P., & Kempný, M. (1998). Matrix-induced effects: A critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. *Journal of Chromatography A*, 800(2), 283–295. [http://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01145-X](http://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01145-X)
- Jaramillo Grajales, M. (2016). *Inmunosensor piezoeléctrico para la detección de un biomarcador de tuberculosis*.
- Jaramillo, M. (2016). *Inmunosensor piezoeléctrico para la detección de un biomarcador de tuberculosis*.
- Jaramillo, M., Torres, R. a, Pabón, E., Marín, P. a, Barrientos, K., Montagut, Y. J., & Robledo, J. a. (2015). Diagnóstico de tuberculosis: desde lo tradicional hasta el desarrollo actual. *Medicina & Laboratorio*, 21(7–8), 311–332.
- Keeler, E., Perkins, M. D., Small, P., Hanson, C., Reed, S., Cunningham, J., ... Dye, C. (2006). Reducing the global burden of tuberculosis: the contribution of improved diagnostics. *Nature*, 444 Suppl, 49–57. <http://doi.org/10.1038/nature05446>
- Kunst, H. (2006). Diagnosis of latent tuberculosis infection: The potential role of new technologies. *Respiratory Medicine*, 100(12), 2098–2106. <http://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.02.032>
- Liu, H., Wang, Z., Liu, Y., Xiao, J., & Wang, C. (2006). Enthalpy change and mechanism of oxidation of o -phenylenediamine by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase, 443, 173–178. <http://doi.org/10.1016/j.tca.2006.01.005>
- Lonnroth, K., & Raviglione, M. (2008). Global epidemiology of tuberculosis: prospects for control. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 29(5), 481–491. <http://doi.org/10.1055/s-0028-1085700>
- López, M. (2015). *Informe final tuberculosis, Colombia, 2015*.
- López, M. (2016a). *Informe final tuberculosis, Colombia, 2016*.
- López, M. (2016b). *Informe final tuberculosis, Colombia, 2016*.
- Marín, P. a, Botero, L. E., Robledo, J. a, Murillo, A. M., Torres, R. a, Montagut, Y. J., ... Jaramillo, M. (2015a). Mycobacterium tuberculosis 38 kDa Antigen Purification and Potential Diagnostic Use by Piezoelectric Immunosensors. *Acta Biol. Colomb*, 20(1),
- La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

129–139. <http://doi.org/10.15446/abc.v20n1.40731>

Marín, P. a, Botero, L. E., Robledo, J. a, Murillo, A. M., Torres, R. a, Montagut, Y. J., ... Jaramillo, M. (2015b). Mycobacterium tuberculosis 38 kDa Antigen Purification and Potential Diagnostic Use by Piezoelectric Immunosensors. *Acta Biol. Colomb*, 20(1), 129–139. <http://doi.org/10.15446/abc.v20n1.40731>

Monaghan, M. L., Doherty, M. L., Collins, J. D., Kazda, J. F., & Quinn, P. J. (1994). The tuberculin test. *Veterinary Microbiology*, 40(1–2), 111–124.

Noor, K. M., Shephard, L., & Bastian, I. (2015). Molecular diagnostics for tuberculosis. *Pathology*, 47(3), 250–256. <http://doi.org/10.1097/PAT.0000000000000232>

NYGREN, H., & STENBERG, M. (1985). Kinetics of Antibody-Binding to Surface-Immobilized Antigen: Influence of Mass Transport on the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ( ELISA ) Enzyme-linked immunosorbent assay. *Academic Press*, 107(2), 560–566.

Ochoa, L. A. O., Ruiz, M., & Sueiro, A. (1983). Propiedades reologicas del esputo. [http://doi.org/10.1016/S0300-2896\(15\)32260-2](http://doi.org/10.1016/S0300-2896(15)32260-2)

Organización Panamericana de la Salud. (2008). Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte I Baciloscopia. *Tuberculosis*, 64. <http://doi.org/10.1101/pdb.prot066894>

Palomino, J. C., Cardoso, S., & Ritacco, V. (2007). *Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care* (First). Retrieved from TuberculosisTextbook.com

Paz, N. (2005). Evaluación de la baciloscopia , cultivo y reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar Evaluation of Baciloscopia , Cultivation and Polimerasa Chain Reaction for the Diagnostic of Lung Tuberculosis. *Sangre (Saragossa)*, 33(2), 119–131.

Penalva, J. (2000). Inmunoensayos en medios orgánicos para el análisis en línea de plaguicidas Inmunoensayos en medios orgánicos para el análisis en línea de plaguicidas, 1–223.

Plikaytis, B. D., Turner, S. H., Gheesling, L. L., & Carlone, G. M. (1991). Comparisons of Standard Curve-Fitting Methods To Quantitate Neisseria meningitidis Group A Polysaccharide Antibody Levels by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(7), 1439–1446.

Price, C. P., & Newman, D. J. (1991). Principles and Practice of Immunoassay. Palgrave Macmillan UK. Retrieved from 10.1007/978-1-349-11234-0

Schluger, N. W., & Rom, W. N. (1998). State of the Art The host: Immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 157(19), 679–691.

Thermo Fisher Scientific. (n.d.-a). ELISA Development and Optimization. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/co/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/elisa-development-optimization.html>

Thermo Fisher Scientific. (n.d.-b). Multiskan™ FC Microplate Photometer. Retrieved from

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/51119000>

Thermo Fisher Scientific. (n.d.-c). Wellwash™ Microplate Washer. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/5165000>

Tijssen, P. (1985). *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*. Elsevier.

Torrelles, J. B., & Schlesinger, L. S. (2010). Diversity in Mycobacterium tuberculosis mannosylated cell wall determinants impacts adaptation to the host. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 90(2), 84–93. <http://doi.org/10.1016/j.tube.2010.02.003>

Voynow, J. A., & Mengr, B. K. R. (2009). Mucins, Mucus, and Sputum. *CHEST*, 135(2), 505–512. <http://doi.org/10.1378/chest.08-0412>

World Health Organization. (2017). *GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2017*.

## **ANEXOS**

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.